

Augenklinik und Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin  
Berlin

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium** (Dr. rer. nat.)

# **Gentransfer in korneale Endothelzellen: nicht-virale und virale Ansätze zur Modulation der Endothelzellfunktion und allogenen Immunreaktion**

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der  
Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl. Biologin Haike Dannowski  
geboren am 29.03.1973 in Rüdersdorf bei Berlin

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Pleyer
2. Prof. Dr. Richard Lucius
3. PD Dr. Thomas Ritter

Datum der Einreichung: 16.02.2004

Datum der Promotion: 07.07.2004

## Inhalt

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b><u>Die Kornea</u></b>	<b>9</b>
1.1.1	<u>Das korneale Endothel</u>	9
<b>1.2</b>	<b><u>Keratoplastik</u></b>	<b>11</b>
1.2.1	<u>Problem: Hornhautkonservierung vor Keratoplastik</u>	12
1.2.2	<u>Problem: Abstoßungsreaktionen nach Keratoplastik</u>	13
1.2.3	<u>Prävention der Immunreaktionen nach Keratoplastik</u>	15
1.2.4	<u>Neue Ansätze zur Prävention von Abstoßungsreaktionen kornealer Transplantate</u>	15
1.2.5	<u>Gentherapie zur Modulation des kornealen Endothels</u>	16
1.2.5.1	<u>Nicht-viraler Gentransfer mittels Lipiden</u>	16
1.2.5.2	<u>Gentransfer mittels viraler Vektoren</u>	18
1.2.5.3	<u>Adenovirale Vektoren</u>	18
1.2.5.4	<u>Vor- und Nachteile adenoviraler Vektoren</u>	20
1.2.6	<u>Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) als Kandidat für die Verbesserung der prä-operativen Ausgangssituation kornealer Transplantate</u>	21
1.2.7	<u>Modulation der immun-vermittelten Transplantatabstoßung</u>	22
1.2.7.1	<u>Das Th1-/Th2-„Paradigma“</u>	22
1.2.7.2	<u>Interleukin-4 (IL-4)</u>	23
1.2.7.3	<u>Interleukin-10 (IL-10)</u>	23
1.2.7.4	<u>Gentransfer von IL-4 und IL-10 zur Modulation der Transplantatabstoßung</u>	24
	<b><u>Aufgabenstellung</u></b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b><u>Methoden</u></b>	<b>26</b>
2.1.1	<u>Klonierungsarbeiten mit dem aFGF-Plasmid</u>	26
2.1.1.1	<u>Herstellung des aFGF-Plasmids</u>	26
2.1.1.2	<u>Vermehrung des aFGF-Plasmids</u>	26
2.1.2	<u>Kultivierung der humanen kornealen Endothelzelllinie</u>	28
2.1.2.1	<u>HCEC-Zellkultur</u>	28
2.1.2.2	<u>Kryokonservierung und Auftauen der Zellen</u>	29
2.1.3	<u>Lipid-vermittelter Gentransfer in HCEC</u>	29
2.1.3.1	<u>Transfektionen von HCEC</u>	29
2.1.3.2	<u>Gentransfer von aFGF</u>	30
2.1.4	<u>Expressionsuntersuchungen auf Protein-Ebene</u>	31
2.1.4.1	<u>Zelllyse</u>	31
2.1.4.2	<u>Gesamtproteinbestimmung</u>	31

2.1.4.3	<a href="#">Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot</a>	32
2.1.5	<a href="#">Gentransfer in der Keratoplastik</a>	32
2.1.5.1	<a href="#">Adenovirus-vermittelter Gentransfer</a>	32
2.1.5.2	<a href="#">Liposomaler Gentransfer in <i>ex vivo</i> kultivierte Ratten-Korneae</a>	34
2.1.5.3	<a href="#">Untersuchungen zur Zytokinexpression mittels ELISA</a>	35
2.1.5.4	<a href="#">Transplantation von Rattenhornhäuten</a>	35
2.1.5.5	<a href="#">Gemischte Lymphozytenkultur zur Überprüfung der Immunreaktionen im Transplantatempfänger</a>	36
2.1.5.6	<a href="#">Histologie</a>	38
2.1.6	<a href="#">Statistische Auswertung</a>	38
2.2	<a href="#">Materialien</a>	38
2.2.1	<a href="#">Lösungen und Puffer</a>	38
2.2.1.1	<a href="#">Puffer für Plasmidpräparation</a>	38
2.2.1.2	<a href="#">Puffer für Agarose-Gelelektrophorese</a>	39
2.2.1.3	<a href="#">Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</a>	39
2.2.1.4	<a href="#">Puffer für Western-Blot</a>	39
2.2.1.5	<a href="#">Puffer für IL-4 ELISA</a>	40
2.2.1.6	<a href="#">Lösungen für <math>\beta</math>-Galaktosidase-Färbung</a>	40
2.2.1.7	<a href="#">Lösungen für MLR</a>	40
2.2.1.8	<a href="#">Lösungen für FACS-Analyse</a>	41
2.2.2	<a href="#">Fluoreszenzfarbstoffe</a>	41
2.2.3	<a href="#">Antikörper</a>	41
2.2.4	<a href="#">Transfektionsmaterialien</a>	41
2.2.5	<a href="#">DNA-Vektoren</a>	41
2.2.6	<a href="#">Adenovirale Konstrukte</a>	41
2.2.7	<a href="#">Proteine</a>	41
2.2.8	<a href="#">Elektronenmikroskopie</a>	42
2.2.9	<a href="#">Transplantationsmaterialien</a>	42
2.2.10	<a href="#">Biologische Materialien</a>	42
2.2.10.1	<a href="#">Zelllinien und Medien</a>	42
2.2.10.2	<a href="#">Versuchstiere</a>	42
2.2.11	<a href="#">Versuchssysteme (Kits) und Enzyme</a>	43
2.2.12	<a href="#">Verbrauchsmaterialien</a>	43
2.2.13	<a href="#">Geräte, Messgeräte</a>	43
3	<a href="#">ERGEBNISSE</a>	44
3.1	<a href="#">Nicht-viraler Gentransfer in humane korneale Endothelzellen</a>	44
3.1.1	<a href="#">Optimierung der Gentransfer-Bedingungen für HCEC</a>	44
3.1.1.1	<a href="#">Beta-Galaktosidase (<math>\beta</math>-gal)-Test</a>	44

3.1.1.2	<a href="#">Durchflusszytometrie zur exakten Bestimmung von Effizienz und Toxizität der verwendeten Lipide</a>	45
3.1.2	<a href="#">Proliferationsanalyse der HCEC nach Gentransfer von aFGF</a>	49
3.1.3	<a href="#">Expression von aFGF nach Gentransfer in HCEC</a>	53
<b>3.2</b>	<b><a href="#">Einsatz von Gentransfermethoden in der Keratoplastik</a></b>	<b>54</b>
3.2.1	<a href="#">Adenoviraler Gentransfer</a>	54
3.2.1.1	<a href="#">Adenoviraler Marker-Gentransfer in HCEC und <i>ex vivo</i> kultivierte Rattenhornhäute</a>	54
3.2.1.2	<a href="#">In vitro-Untersuchungen zur Genexpression nach adenoviralem Gentransfer</a>	56
3.2.1.3	<a href="#">Kombinierter adenoviraler Gentransfer (AdvIL-10/AdriL-4)</a>	56
3.2.1.4	<a href="#">Adenoviraler Gentransfer zur Modulation der Abstoßungsreaktion transplanterter Ratten-Hornhäute</a>	57
3.2.1.5	<a href="#">Adenoviraler Gentransfer von vIL-10 in der Keratoplastik</a>	58
3.2.1.6	<a href="#">Kombinierter adenoviraler Gentransfer von vIL-10 und rIL-4 in der Keratoplastik</a>	59
3.2.1.7	<a href="#">Einfluss des adenoviral exprimierten Zytokins vIL-10 durch <i>ex vivo</i> transduzierte Hornhäute auf die Immunreaktion nach Keratoplastik</a>	60
3.2.1.8	<a href="#">Immunhistologische Untersuchungen</a>	63
3.2.2	<a href="#">Liposomal Gentransfer von vIL-10 in der Keratoplastik</a>	65
3.2.2.1	<a href="#">In vitro-Untersuchungen zur Genexpression nach liposomalem Gentransfer</a>	66
3.2.2.2	<a href="#">Einfluss der vIL-10-Produktion durch liposomal transfizierte Hornhäute auf die Transplantatüberlebenszeit</a>	66
<b>4</b>	<b><a href="#">DISKUSSION</a></b>	<b>68</b>
4.1	<a href="#">Das Hornhautendothel als Zielstruktur für die Gentherapie</a>	69
4.1.1	<a href="#">Nicht-viraler Gentransfer in das Hornhautendothel</a>	69
4.1.1.1	<a href="#">Einsatz verschiedener Lipide für den Gentransfer in HCEC</a>	70
4.1.1.2	<a href="#">Einsatz von Protaminsulfat zur Steigerung der Gentransfereffizienz</a>	71
4.1.1.3	<a href="#">Gentransfer von aFGF und Wirkung auf die Proliferation von Hornhautendothelzellen</a>	72
4.1.1.4	<a href="#">Beeinflussung des nicht-viralen Gentransfers durch Ladungsunterschiede und Helfer-Lipid</a>	73
4.1.1.5	<a href="#">Die extrazelluläre Matrix und ihr Einfluss auf die Wirkung von aFGF</a>	74
4.2	<a href="#">Gentransfer in der Keratoplastik</a>	76
4.2.1	<a href="#">Viraler Gentransfer in das Hornhautendothel</a>	76
4.2.1.1	<a href="#">Einsatz der immunmodulatorischen Zytokine vIL-10 und rIL-4 in Transplantationsmodellen</a>	77
4.2.2	<a href="#">Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse</a>	79
4.3	<a href="#">Fazit und Ausblick</a>	81
	<b><a href="#">LITERATURVERZEICHNIS</a></b>	<b>85</b>
	<b><a href="#">ANHANG</a></b>	<b>95</b>

<a href="#"><u>Publikationen und Kongressbeiträge</u></a> .....	95
---	----

<a href="#"><u>Selbstständigkeitserklärung</u></a> .....	101
--	-----

**Zusammenfassung**

Bei der Hornhauttransplantation (Keratoplastik) handelt es sich um die häufigste Transplantation humanen Gewebes. Das Hornhautendothel, eine empfindliche Zellschicht auf der Innenseite der Kornea, verfügt nicht über die Fähigkeit, Zellverluste durch Proliferation auszugleichen. Zwei grundsätzliche Probleme ergeben sich aus dieser Eigenschaft des kornealen Endothels für die Keratoplastik: ein Endothelzellverlust tritt zum einen während der Hornhautkonservierung vor Keratoplastik auf und führt zu einem Ausschluss vieler Transplantate, zum anderen ist er oftmals im Zuge von immunvermittelten Abstoßungsreaktionen oder in Folge chronischer Vorgänge nach Keratoplastik zu beobachten. Aus diesem Grund ist eine möglichst hohe Endothelzelldichte auf kornealen Transplantaten eine Voraussetzung für den Erfolg einer Keratoplastik.

Das erste Ziel dieser Arbeit war deshalb die Übertragung des Gens für den aziden FGF (aFGF) in korneale Endothelzellen mit Hilfe des nicht-viralen Gentransfers. Dazu wurden verschiedene Lipid-Formulationen für den Gentransfer in humane korneale Endothelzellen *in vitro* optimiert. Der Einsatz von DAC-30 und Lipofectin für den aFGF-Gentransfer führte zu einer deutlichen Proliferationssteigerung (um ca. 50 %) der Zellen, womit der Einsatz dieses Wachstumsfaktors eine gute Möglichkeit darzustellen scheint, die prä-operative Ausgangssituation kornealer Transplantate zu verbessern.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit Untersuchungen zur Immunmodulation nach Keratoplastik. Eine Hauptrolle bei der Abstoßung kornealer Transplantate spielen CD4+ T-Lymphozyten. In anderen Transplantationsmodellen konnte durch die lokale Überexpression immunmodulatorischer Zytokine die Entstehung und Aktivierung dieser Zellen gehemmt und eine verlängerte Transplantatüberlebenszeit erzielt werden. Mit Hilfe gentherapeutischer Vektoren (Adenoviren, Liposomen) wurden die immunmodulatorischen Zytokine vIL-10 und rIL-4 *ex vivo* in korneale Transplantate eingebracht. Nach erfolgreichen *in vitro*-Untersuchungen zur Genexpression wurden die transduzierten/transfizierten Hornhäute in einem starken Abstoßungsmodell der Ratte transplantiert, was jedoch zu keiner signifikanten Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führte.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass der lokale Gentransfer von vIL-10 in der Keratoplastik nicht für eine Immunmodulation geeignet ist, und dass sowohl die Zytokindosis, als auch der Zeitpunkt und der Ort der Vektorapplikation eine entscheidende Rolle für den Transplantationserfolg spielen.

Keratolastik  
korneales Endothel  
aFGF  
vIL-10  
Adenovirus  
kationische Lipide  
Gentransfer

### Abstract

Keratoplasty is the most common transplantation of human tissue. The corneal endothelium constitutes a damagable cell layer on the inner surface of the cornea, unable to proliferate. From this, two general problems arise for the outcome of keratoplasty: loss of corneal endothelial cells occurs on the one hand during corneal long time storage before keratoplasty and enforces the lack of donor tissue, on the other hand it is often correlated with immune mediated rejections as well as with chronic processes after keratoplasty. Therefore an endothelial cell number as high as possible on corneal grafts displays a requirement for successful keratoplasties.

The first aim of this study was non-viral gene transfer of the aFGF (acidic FGF) gene in corneal endothelial cells. Different lipid formulations were optimized for gene transfer in human corneal endothelial cells *in vitro*. Application of DAC-30 and Lipofectin for aFGF gene transfer clearly showed a stimulating effect on cell proliferation (approximately 50 %). Thus, the use of aFGF seems to be a good possibility for improving the pre-operative situation of corneal allografts.

The second part of this study deals with the immune modulation after keratoplasty. CD4+ T-lymphocytes play a key role in rejection processes after keratoplasty. Local over expression of immunomodulatory cytokines in different transplantation models could inhibit the development and activation of these cells and was able to prolong the allograft survival time. Using different gene therapeutic vectors (adenoviruses, liposomes) the immunomodulatory cytokines vIL-10 and rIL-4 were transferred *ex vivo* in corneal allografts. After successfully determined gene expression *in vitro*, the transduced/transfected corneal allografts were transplanted in a strong rejection model of the rat. However, this was not sufficient in prolonging the graft survival time significantly.

This study provides indications, that local gene transfer of vIL-10 in keratoplasty is not suitable for an immune modulation, and that both cytokine dose as well as time point and site of vector application play an important role for successful transplantation.

Keratoplasty  
corneal endothelium  
aFGF  
vIL-10  
adenovirus  
cationic lipids  
gene transfer



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Kornea

Das Auge ist das wichtigste Sinnesorgan des Menschen. Über neunzig Prozent aller Sinneswahrnehmungen werden über die Augen aufgenommen. Die Kornea bildet die sichtbare äußere Grenze zur Außenwelt und nimmt ein Sechstel der äußeren Augenoberfläche ein. Neben ihrer lichtbrechenden Funktion, die sie als transparente und avaskuläre Struktur erfüllt, stellt sie gleichzeitig eine mechanisch stabile und chemisch impermeable Barriere zur Außenwelt dar. Der Sauerstoffbedarf der Korneazellen wird zum größten Teil aus der Umgebung über die vordere Augenoberfläche gedeckt. Ihre Versorgung mit Nährstoffen erfolgt über den Tränenfilm und das Kammerwasser in der Vorderkammer des Auges. Die humane Kornea ist aus fünf „Schichten“ aufgebaut: dem Epithel an der äußeren Oberfläche, seiner Basalmembran (Bowman Schicht), dem Stroma, der Basalmembran des Endothels (Descemet Membran) und dem Endothel selbst, als innerer Oberfläche. Einige der Schutzfunktionen und optischen Eigenschaften der Kornea werden durch angrenzende Strukturen bestimmt, z.B. Bindehaut und Tränendrüsen, deren Sekrete durch den Lidschlag über die Kornea verteilt werden.

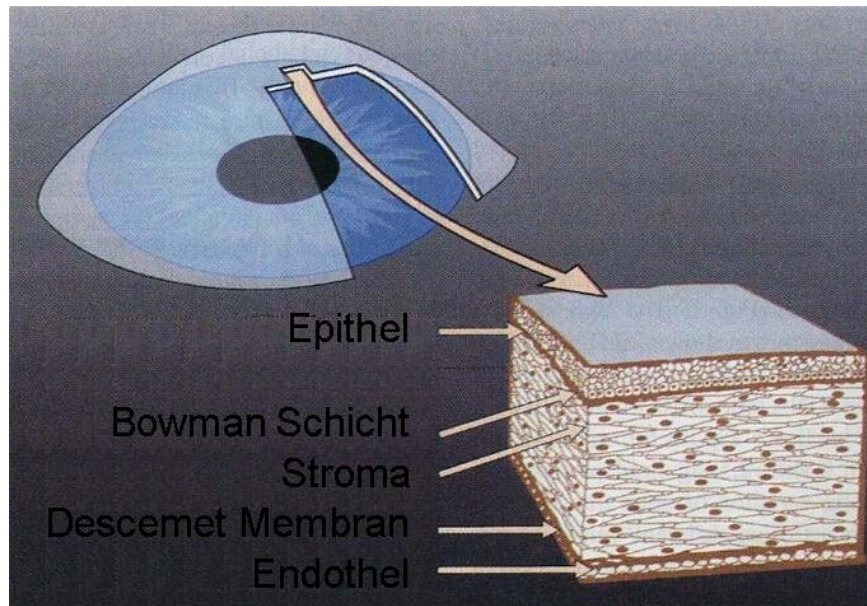


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der humanen Kornea.

### 1.1.1 Das korneale Endothel

Im Gegensatz zu Epithel und Stroma stellt das korneale Endothel eine einzellige Schicht dar. Es weist Zellen mit einer typischen hexagonalen Form auf (Abb.2). Das korneale Endothel nimmt eine Schlüsselfunktion für die Physiologie und Transparenz der Kornea ein. Es arbeitet

als aktive und passive Barriere zwischen der Vorderkammer des Auges und dem kornealen Stroma.

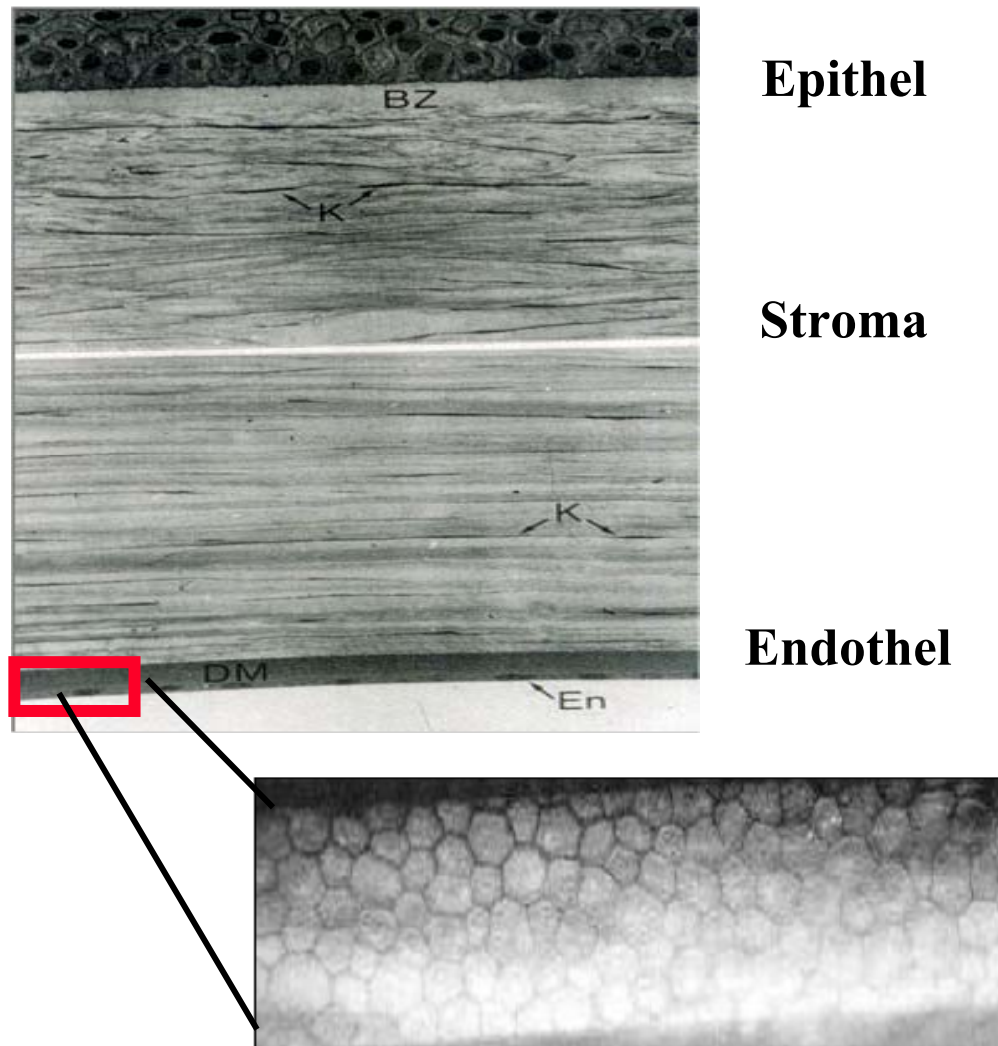


Abbildung 2: Querschnitt durch eine Kornea und spekularmikroskopische Ansicht des kornealen **Endothels** (aus Wolff's Anatomy, 8th Edition, 1997). **BZ**=Bowmann-Schicht, **K**=Keratozyten, DM=Descemet Membran, En=Endothel.

Das Endothel ist für die Funktion der Kornea essentiell. Normalerweise ist es durch seine privilegierte Lage in der Vorderkammer des Auges geschützt. Es stellt jedoch eine empfindliche Zellschicht dar, deren Unversehrtheit und Lebensfähigkeit für den Erfolg jedes intraokulären Prozesses aufrechterhalten werden muss. Trotz der entscheidenden Bedeutung dieser Zellschicht, ist seine regenerative Kapazität stark eingeschränkt. Die Zellen des humanen kornealen Endothels sind von Geburt an amitotisch. Im Gegensatz zu vaskulären Endothelzellen, die eine rasche Zellteilung aufweisen, werden korneale Endothelzellverluste primär durch Vergrößerung der umliegenden Zellen kompensiert, um das Eindringen von Kammerwasser ins Stroma zu verhindern und so seine Transparenz aufrechtzuerhalten (Joyce, 2003). Sie besitzen außerdem die Fähigkeit, in Bereiche von Zellverlusten einzuwandern.

Vermutlich wird die normale korneale Zellfunktion aufrechterhalten, solange die Endothelzellen eine konfluente Zellschicht auf der Descemet Membran ausbilden können. Dies wird z.B. während des postnatalen Wachstums der Kornea, durch normalen Zellverlust im Zuge des Alterungsprozesses und nach intraokulären Operationen und Traumata erforderlich.

*In vitro*-Studien mit humanen kornealen Endothelzellen sind aufgrund ihrer begrenzten Passagierbarkeit, dem Verlust der charakteristischen hexagonalen Morphologie und der notwendigen Zugabe verschiedener exogener Wachstumsfaktoren ins Kulturmedium, relativ aufwändig und schwierig durchzuführen (Engelmann und Böhnke, 1990). Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die Nutzung immortalisierter Zelllinien, welche ausreichend Zellmaterial und konstante Zelleigenschaften garantieren (Aboalchamat et al., 1999, Bednarz et al., 2000).

Das korneale Endothel steht zudem im Mittelpunkt der Problematik der Hornhauttransplantation. So ist eine Fehlfunktion dieser Zellschicht ein Hauptgrund für korneale Transplantationen. Ebenso stellt das Hornhautendothel als kritische Struktur des Organs auch die Zielstruktur akuter und chronisch verlaufender Immunreaktionen dar, die für 10-50% der Transplantatverluste verantwortlich sind.

## **1.2 Keratoplastik**

Die Hornhauttransplantation (Keratoplastik) stellt die mit Abstand häufigste Transplantation humanen Gewebes dar (in den USA ca. 50 000/Jahr) (Eye Bank Association of Amerika, 2002). Sie bietet die Möglichkeit, den Verlust der Sehkraft, der durch Schäden der Kornea verursacht wird, durch einen Austausch des Gewebes zu behandeln (Larkin, 1994). Solche Schäden umfassen angeborene, traumatische und infektiöse Hornhautveränderungen, zu denen v.a. auch Beeinträchtigungen der Funktion des Hornhautendothels gehören. Nach Angaben der WHO ist davon auszugehen, dass bei einer Häufigkeit von 38 Mio. Erblindungen jede vierte auf Hornhauttrübungen zurückgeführt werden muss (Thylefors et al., 1995).

Die Keratoplastik nimmt aufgrund des Immunprivilegs von Vorderkammer und Kornea eine Sonderrolle in der Transplantationsmedizin ein (Nieder Korn, 1999). Unter dem Immunprivileg versteht man die beschränkte Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf Fremd-Antigene in Kornea und Vorderkammer. Aus diesem Grund können Hornhauttransplantationen auch ohne systemische Immunsuppression oder MHC-Übereinstimmung erfolgreich sein. Für das Immunprivileg sind verschiedenste Mechanismen verantwortlich. Dabei kann es einerseits zu

Ignoranz und/oder Isolation des Fremd-Antigens und andererseits zu einer aktiven Suppression oder Modulation der Immunantwort kommen. Ersteres beruht auf dem Mangel an Blutgefäßen, schwacher lymphatischer Drainage und der geringeren Menge an MHC-II+ Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), z.B. dendritischen Zellen, in der zentralen Kornea (Nieder Korn, 1999). Aktive Suppression und Veränderung der Immunantwort in der Kornea werden durch eine Reihe von Mechanismen verursacht. Zu diesen gehören die Expression von Fas-Ligand (CD95L) auf Strukturen der Vorderkammer (korneale Endothelzellen), die mit Fas (CD95)-exprimierenden aktivierten Lymphozyten interagieren und in diesen Apoptose induzieren (Griffith et al., 1995, Yamagami et al., 1997, Stuart et al., 1997). Die aktive Suppression der Immunantwort wird als „Anterior chamber-associated immune deviation“, kurz ACAID bezeichnet (Nieder Korn, 1999). ACAID beschreibt die experimentelle Beobachtung, dass ein in die Vorderkammer injiziertes Antigen, zur Entwicklung einer systemischen Reduktion der zellulären Antwort führt, wenn dieses Antigen erneut verabreicht wird. Es ist jedoch wichtig, das Immunprivileg als einen relativen und keinen absoluten Schutzmechanismus zu betrachten (Williams und Coster, 1997). So ist es auch hier möglich, dass sich Immunreaktionen entwickeln, die nach Transplantationen zu einer Abstoßungsrate von 30 % im Langzeitverlauf führen können (Alldredge und Krachmer, 1981, Pleyer et al., 1992, Reinhard et al., 1997). Zudem weisen Patienten mit Risikofaktoren, wie Vaskularisation der Hornhaut und Problemen der okulären Oberfläche, eine ungünstige Prognose für das Transplantatüberleben auf, und der Anteil der Transplantatverluste durch Immunreaktionen kann sich hier auf 60 % erhöhen (Stübiger et al., 1995). Zusätzliche Probleme werden durch einen Mangel an geeigneten Spenderhornhäuten verursacht. Zudem wirken sich Endothelzellverluste während der Hornhautkonservierung vor Transplantation und im Nachbeobachtungszeitraum ungünstig auf die Prognose aus. Im postoperativen Verlauf sind akute und chronische Immunreaktionen die wichtigsten Komplikationen nach Hornhauttransplantation. Aus diesem Grund sind neue Ansätze der Prävention der Immunreaktion nach Keratoplastik unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse über den Verlauf dieser Reaktionen notwendig.

### **1.2.1 Problem: Hornhautkonservierung vor Keratoplastik**

Die erfolgreiche Transplantation einer Spenderhornhaut ist in erster Linie von der Vitalität des Spenderendothels abhängig, da die Transparenz der Hornhaut und damit ihre Funktion als optisches Medium von der Unversehrtheit dieses Endothels bestimmt wird. Die Technik der Organkultur, wie sie in Europa gehandhabt wird, ermöglicht bei 35°C Aufbewahrungszeiten

der Spenderhornhaut von bis zu 4 Wochen. Andere Methoden der Hornhautkonservierung, wie die in Amerika gängige Lagerung bei 4°C, erlauben dagegen eine Lagerung der Transplantate für nur 4 Tage (Frueh und Böhnke, 1995).

Allerdings kommt es während der Konservierung der Kornea vor einer Transplantation oftmals zu einem z.T. erheblichen, vermutlich Apoptose-induzierten Verlust an vitalen Endothelzellen. Der normale physiologische Verlust dieser Zellen liegt bei ca. 0,6 % pro Jahr (Bourne et al., 1997). Obwohl die Vitalität des organkultivierten Spenderendothels im Vergleich zu anderen Konservierungsmethoden länger erhalten bleibt, ist nach einer Organkultur von 3-4 Wochen mit einem Zellverlust von etwa 10-20 % zu rechnen. Die Dichte des Endothels unterschreitet dann oftmals den Qualitätsstandard von 2500 Zellen/mm<sup>2</sup>, sodass die betreffenden Hornhäute für eine Transplantation nicht mehr verwendet werden können (Redbrake et al., 1999, Albon et al., 2000).

Es besteht somit großes Interesse, Methoden zu finden, welche die Vitalität des Hornhautendothels während der Konservierung erhalten können. In diesem Zusammenhang stellt der Einsatz von Wachstumsfaktoren einen interessanten Ansatz dar (siehe 1.7).

### **1.2.2 Problem: Abstoßungsreaktionen nach Keratoplastik**

Trotz einer intensivierten immunmodulatorischen Therapie ist bei Risikopatienten mit Abstoßungsreaktionen von bis zu 60 % der Transplantate zu rechnen. Diese Immunprozesse gefährden das Operationsergebnis und können zum Funktionsverlust der transplantierten Hornhaut führen (Pleyer et al., 2001a).

Die Abstoßung kornealer Transplantate kann an drei morphologischen Strukturen erfolgen: Epithel, Stroma und Endothel (Larkin, 1994). Die epitheliale Abstoßung betrifft die äußere Schicht des Transplantats; das Epithel an der Außenseite der Kornea verfügt jedoch über die Fähigkeit sich zu regenerieren und kann in einigen Fällen von Empfängerzellen ersetzt werden. Bei der stromalen Rejektion wandern Leukozyten in das korneale Stroma ein. Diese Form der Abstoßung tritt jedoch nur sehr selten auf. Aus diesem Grund spielen epitheliale und stromale Rejektionen klinisch nur eine untergeordnete Rolle (Larkin, 1994).

Die häufigste und funktionell wichtigste Form der Abstoßung kornealer Transplantate tritt am Endothel auf. In diesem Fall gelangen Leukozyten vermutlich durch die Vorderkammer zur inneren Oberfläche des Transplantats und zerstören seine Endothelzellschicht. Da das Endothel eine nicht-replikationsfähige Zellschicht ist, können diese Schäden nur begrenzt, durch Einwanderung und Vergrößerung von überlebenden Endothelzellen, ausgeglichen

werden. Wird dabei eine kritische Zellzahl unterschritten, führt dies zu einem Eindringen von Kammerwasser ins Stroma und damit zu einer Quellung und Trübung des Transplantats.

Die immunologischen Mechanismen, die der Abstoßung kornealer Transplantate zugrunde liegen, wurden bislang in Modellen von Kaninchen, sowie Maus und Ratte untersucht. Bei der akuten Transplantatabstoßung sind T-Lymphozyten entscheidend an den immunpathologischen Effektormechanismen beteiligt (Abb. 3) (Callanan et al., 1988, Pleyer et al., 1995, Wackenheim-Urlacher, 1995, Niederkorn, 1999).

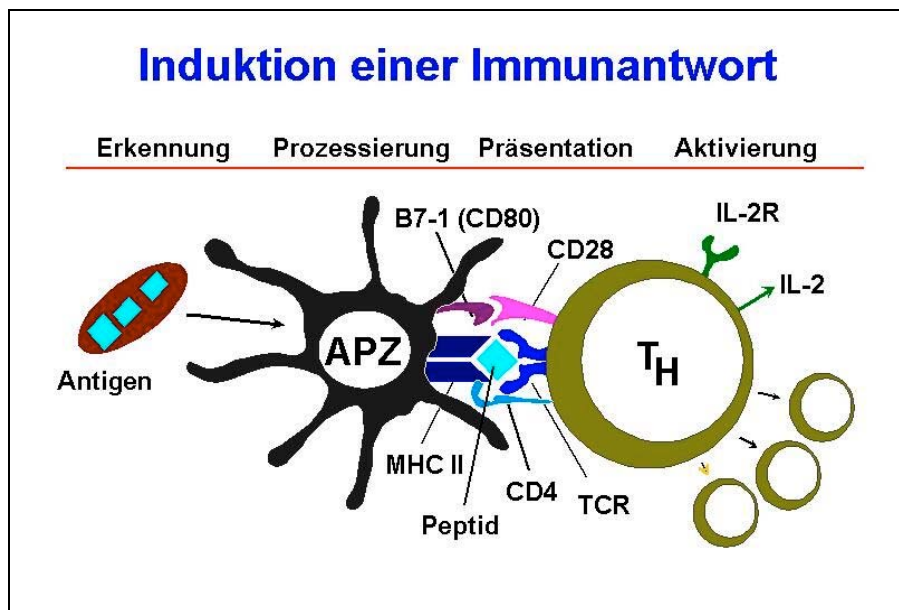


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Induktion einer Immunantwort (nach Pleyer und Ritter, 2003). T-Zellen erkennen ein Antigen und werden durch Interaktionen zwischen TCR-MHC (Signal 1) und ko-stimulatorischen Molekülen (CD28-B7, CD40L-CD40) (Signal 2) aktiviert. Aktivierte T-Zellen sekretieren Zytokine, die wiederum Makrophagen, B-Zellen, zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen aktivieren können. APZ=Antigen-präsentierende Zelle, TH=T-Helferzelle, TCR=T-Zell-Rezeptor, IL-2=Interleukin-2; IL-2R=IL-2-Rezeptor.

Bereits in der frühen afferenten Phase der Immunreaktion können Makrophagen und T-Lymphozyten im Transplantat nachgewiesen werden (Nishi et al., 1990, Holland et al., 1991). Dieser initialen Sensibilisierungsphase schließt sich die Proliferation immunkompetenter Zellen an. Botenstoffe (Zytokine), die von diesen Zellen freigesetzt werden, fördern den Prozess. Pro-inflammatorische Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der akuten Transplantatabstoßung. Dies konnte sowohl im Hornhautgewebe (Transplantat) als auch im Kammerwasser der Transplantatempfänger nachgewiesen werden. Schließlich erfolgt die Infiltration und Zerstörung des Transplantats (efferentes Stadium) (Pleyer und Thiel, 1995, Pleyer et al., 1998). Zu den Entzündungszellen, die nach

Keratoplastik im Kammerwasser nachweisbar sind, gehören auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Möglicherweise spielen auch diese Zellen als Effektoren im Abstoßungsprozess (efferentes Stadium) eine Rolle (Claerhout, 2003).

Die akute Abstoßung findet bei Mäusen innerhalb von 2-6 Wochen nach Transplantation statt und ist durch starke stromale Trübungen gekennzeichnet, die auf Schäden bzw. Verlust der Endothelfunktion zurückzuführen sind. In der normalen Kornea sind keine MHC-II+ tragenden dendritischen Langerhans Zellen (LHZ) vorhanden, die transplantierte Kornea wird jedoch schnell von diesen Zellen infiltriert. Erfolge bei der Verhinderung oder Verzögerung der Abstoßung konnten durch Strategien erzielt werden, die ein Einwandern von dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen (MØ) des Empfängers in das Transplantat verhindern (Dana et al., 1997, Slegers et al., 2000, Slegers et al., 2003).

### **1.2.3 Prävention der Immunreaktionen nach Keratoplastik**

Zur Prävention der Immunreaktion und um diese Faktoren möglichst in den Auswirkungen zu begrenzen, werden klinisch derzeit zwei wesentliche Vorgehensweisen eingesetzt.

- Die Verminderung der Antigendifferenz von Spender und Empfänger durch die Prüfung der Histokompatibilität wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv untersucht. Es liegen jedoch insbesondere zur MHC-Klasse-II Antigendifferenz sehr unterschiedliche Einschätzungen vor, die eine abschließende Beurteilung zur Zeit nicht zulassen (Vail et al., 1994, Gore et al., 1995).
- Daher wird als weiterer und in der klinischen Praxis zur Zeit entscheidender präventiver Ansatz die immunmodulatorische Therapie angewendet (Rinne und Stulting, 1992).

Hier sind die Erfahrungen der Transplantationsmedizin nach Übertragung solider Organe eingegangen. So ist durch die Einführung von immunmodulatorisch wirksamen Pharmaka wie Cyclosporin A, FK 506 oder in jüngerer Zeit von Mycophenolat Mofetil ein wichtiger Beitrag auch für die Therapie nach Hornhauttransplantation geleistet worden (Pleyer et al., 1998). Allerdings sind auch unter Verwendung dieser Maßnahmen Allograftreaktionen zu beobachten.

### **1.2.4 Neue Ansätze zur Prävention von Abstoßungsreaktionen kornealer Transplantate**

Der Endothelzellverlust, der im Zusammenhang mit Hornhauttransplantationen auftritt, hat seine Ursache zum einen in der Konservierung der Kornea vor Keratoplastik, zum anderen aber auch durch den Eingriff selbst, durch mechanische Beanspruchung und immunologische

Prozesse (Gain et al., 2001). Neue Ansätze zur Verbesserung der Endothelvitalität vor Transplantation, die auch Gegenstand dieser Arbeit sind, befassen sich mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Optimierung der Lagerungsbedingungen des Transplantats (Rieck et al., 2003). Dies beinhaltet auch die genetische Modifizierung von kornealen Endothelzellen durch zytoprotektive oder anti-apoptotische Gene, die einen Schutz dieser Zellen bei der Lagerung und der Allotransplantation vermitteln können. Andere derzeit aktuelle Ansätze befassen sich mit der Transplantation von Endothelzellen (Aboalchamat et al., 1999, Engelmann et al., 1999) oder Stammzellen auf die Spenderkornea oder mit der Suppression der T-Zellaktivierung durch Hemmung der Ko-Stimulation z.B. mit Hilfe von CTLA4-Ig (Comer et al., 2002).

### **1.2.5 Gentherapie zur Modulation des kornealen Endothels**

Die anatomischen und immunologischen Eigenheiten der Kornea stellen eine gute Voraussetzung für genetische Manipulationen dar. Insbesondere das korneale Endothel lässt sich problemlos sowohl mit viralen als auch mit nicht-viralen Vektoren transfizieren (Larkin et al., 1996). Durch die *ex vivo*-Kultivierung der Kornea ist ein gezielter Transfer des therapeutischen Gens in die Zielzellen möglich. Ein großer Vorteil dieser Anwendung liegt in der Vermeidung einer systemischen Applikation und der damit verbundenen unerwünschten Verbreitung des Vektors in den gesamten Organismus. Die exponierte Lage der Kornea ermöglicht darüber hinaus die Beurteilung des Behandlungserfolgs ohne zusätzlichen operativen Eingriff.

Heute gebräuchliche Gentransfervehikel sind vor allem virale und nicht-virale Vektoren, wobei an der Kornea insbesondere Adenoviren und Lipide zum Einsatz kommen.

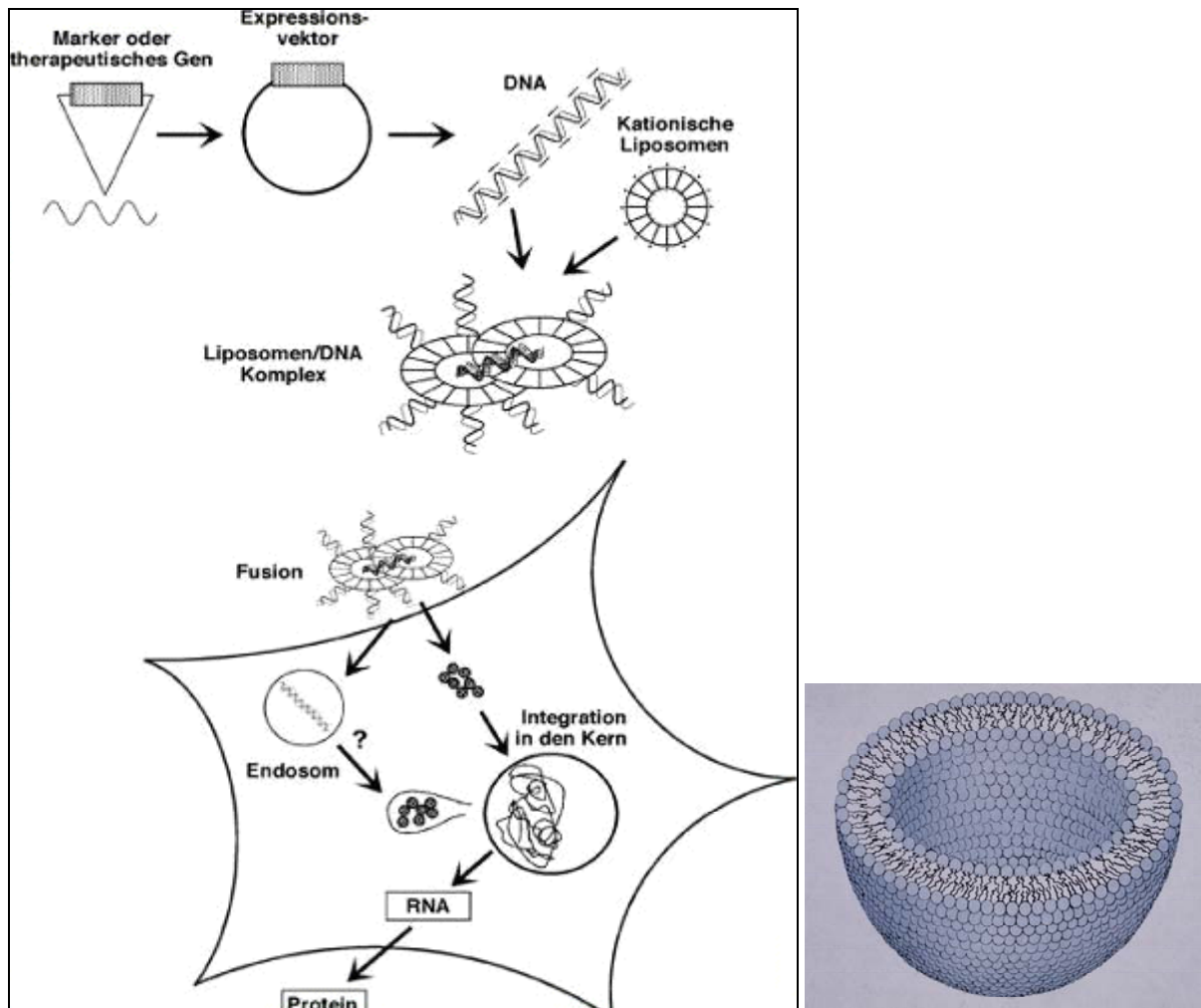
#### **1.2.5.1 Nicht-viraler Gentransfer mittels Lipiden**

Vor allem kationische Lipide, stellen vielversprechende Gentransfer-Vehikel dar, die mit der negativ geladenen DNA Komplexe ausbilden. An verschiedenen Organen, wie z.B. Lunge, Haut und Gefäßendothelien, konnten kationische Lipide *in vivo* bereits vor einiger Zeit eingesetzt werden (Nabel et al. 1993).

Die Liposomen können, als eine Sonderform der Lipide, aus Phospholipiden mit oder ohne Cholesterol in einer Größe von 20 nm - 10 µm hergestellt werden. Liposomen besitzen eine oder mehrere Lipid-Doppelschichten, die durch wässrige Kompartimente voneinander getrennt sind (Abb.4). Jede Lipid-Doppelschicht umschließt einen wässrigen Kern. Liposomen können diverse Substanzen und Chemikalien einschließen; hydrophile Agentien



werden in wässrigen Regionen gelöst, während hydrophobe Substanzen mit der Lipid-Doppelschicht assoziiert sind.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Lipid-vermittelten Gentransfers und ein Querschnitt durch ein Liposom.

Der erfolgreiche lipid-vermittelte Gentransfer erfordert eine effiziente Aufnahme des genetischen Materials, selektive Bindung an die Zielzelle, die Übertragung ins Zytoplasma ohne lysosomale Degradation und eine nachfolgende Aufnahme in den Zellkern (Abb. 4).

Die Zusammensetzung der Lipide und ihre damit verbundenen Eigenschaften üben den größten Einfluss auf den Prozess des Gentransfers aus.

Lipide stellen eine Alternative zum Gebrauch viraler Vektoren dar und verfügen über eine Vielzahl von Vorteilen. So sind sie relativ einfach zu handhaben, besitzen kaum immunogene Eigenschaften und sind daher für die wiederholte Anwendung geeignet. Ein weiterer Vorteil besteht in ihrer kommerziellen Verfügbarkeit. Nachteile des lipid-vermittelten Gentransfers liegen in der relativ geringen Transfektionseffizienz ebenso wie in einer starken Varianz aller

Eigenschaften in Abhängigkeit vom Zelltyp (George et al., 2000, Pleyer und Dannowski, 2002).

### 1.2.5.2 Gentransfer mittels viraler Vektoren

Virale Vektoren besitzen sehr effiziente und spezifische Mechanismen zum Einschleusen von DNA in die Wirtszellen und wurden durch Entfernen ihrer pathogenen Effekte für die gefahrlose Anwendung im Menschen nutzbar gemacht. Das Problem dieser Vektoren ist jedoch, dass sich oft starke Immunantworten gegen ihre viralen Bestandteile herausbilden und so eine langfristige Expression der übertragenen Gene nicht immer möglich ist (Verma und Somia, 1997, Ritter et al., 2002, Olive et al., 2002).

Die am häufigsten eingesetzten viralen Vektoren sind Retroviren und Adenoviren, aber auch Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren kommen verstärkt zur Anwendung. Tabelle 1 fasst einige Eigenschaften verschiedener Gentransfervektoren zusammen.

Tabelle 1: Virale und nicht-virale Gentransfervektoren

Virale	Expression	Transduktion von ruhenden Zellen	Immunogenität
Adenovirus	transient	ja	hoch
Retrovirus	stabil	nein	gering
Lentivirus	stabil	ja	gering
Herpes Simplex Virus	transient	ja	hoch
Adeno-assoziiertes Virus	stabil	ja	gering
Nicht-viral	Expression	Transduktion von ruhenden Zellen	Immunogenität
Nackte DNA	transient	ja	gering
Liposomen	transient	ja	gering
DNA-Konjugat	transient	ja	gering

### 1.2.5.3 Adenovirale Vektoren

Adenoviren enthalten doppelsträngige, lineare DNA mit einer Größe von 36 bis 38 kb, an deren Enden sich invertierte Sequenzwiederholungen befinden. Diese Enden sind während der

DNA-Replikation für die Initiation der Doppelstrangsynthese verantwortlich. Das Genom besteht aus fünf kodierenden Bereichen. Die Bereiche E1 bis E4 werden früh während der Infektion aktiviert, die Gruppe der spät exprimierten Gene (L) ist für die Synthese der viralen Strukturproteine verantwortlich.

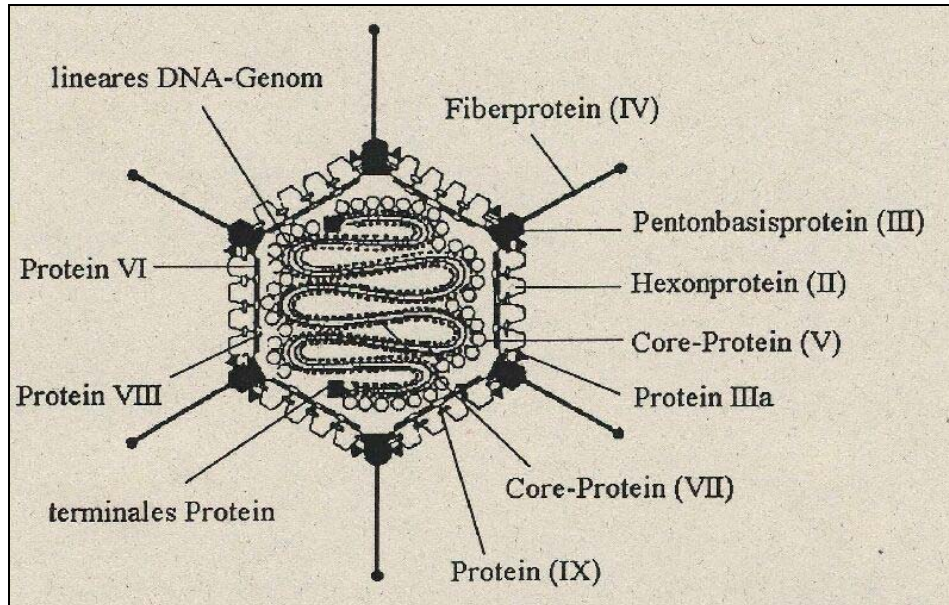


Abbildung 5: Adenoviruspartikel (nach Modrow & Falke, 1997)

Der adenovirale Infektionszyklus umfasst mehrere Schritte. Zunächst erfolgt die Adsorption des Viruspartikels an Zell-Oberflächenrezeptoren (CAR, Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor) (Bergelson et al., 1997). Dabei spielen sowohl die Fiberproteine als auch die Pentonproteine auf der Partikeloberfläche eine Rolle (Abb. 5). Letztere interagieren mit Oberflächenintegrinen der Wirtszelle (Huang et al., 1996). Die Aufnahme der Virus-Rezeptor-Komplexe in das Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose. Unter Verlust der Fiber- und Pentonbasisproteine werden die Viren aus dem endozytotischen Vesikel entlassen und gelangen durch Bindung an Mikrotubuli zu den Kernporen. Der virale DNA-Protein-Komplex wird durch schrittweisen Kapsidabbau freigesetzt und in den Nukleus aufgenommen, wo über das terminale Protein die Assoziation mit der Kernmatrix erfolgt. Das Adenovirusgenom integriert nicht in das Wirtsgenom sondern liegt als episomale Einheit im Zellkern vor (Horwitz, 1990). Nach Transkription der frühen und späten Gene, Synthese der entsprechenden Proteine, DNA-Replikation und Morphogenese erfolgt die Freisetzung der neuen Virionen aus der an den Folgen der Infektion zerstörten Zelle.

#### 1.2.5.4 Vor- und Nachteile adenoviraler Vektoren

Adenovirale Vektoren besitzen für den *in vivo*-Gentransfer eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Vektoren. Sie sind in der Lage, sowohl sich teilende, als auch ruhende Zellen der verschiedensten Art mit hoher Effizienz *in vitro* und *in vivo* zu transduzieren, im Gegensatz zu retroviralen Vektoren, die nur sich teilende Zellen transduzieren können. Gerade bei *ex vivo*-Experimenten an der Kornea zeigten sich diese Vektoren als effizient (Larkin et al., 1996, Fehervari et al., 1997, Oral et al., 1997, Ritter et al., 1999a, Klebe et al., 2001). So konnten Larkin et al. (1996) und Fehervari et al. (1997) zeigen, dass Adenoviren fast ausschließlich die Endothelzellen der Kornea transduzieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass adenovirale Vektoren in hohen Titern ( $10^{11}$ - $10^{12}$  pfu/ml) zu gewinnen sind. Sie integrieren nicht in die Wirts-DNA, sondern replizieren als extrachromosomale Elemente im Zellkern der Wirtszelle, wodurch Insertionsmutationen vermieden werden (Verma & Somia, 1997, Kay et al., 2001). Durch die relativ einfache Manipulierbarkeit ihres Genoms ist es z.B. möglich, das Transgen unter die Kontrolle eines sehr starken Promotors zu setzen und es damit in großen Mengen zu exprimieren. Um adenovirale Vektoren relativ gefahrlos handhaben zu können, ist es üblich, die E1-Genregion der adenoviralen DNA durch das Transgen zu ersetzen. Dieser Bereich des adenoviralen Genoms wirkt auf die für die Virusreplikation verantwortliche E2-Region transaktivierend. Dadurch sind E1-deletierte rekombinante Adenoviren zwar zur Transduktion, jedoch nicht zur Replikation befähigt und können sich somit nicht unkontrolliert vermehren (Kolls et al., 1994). Die gezielte Virusvermehrung erfolgt in bestimmten Verpackungszelllinien *in vitro* (293 [Graham et al., 1977], 911 [Fallaux et al., 1996]), die die E1A- und E1B-Gene konstitutiv exprimieren (Abb. 6).

Der Hauptnachteil adenoviraler Vektoren liegt in der Immunantwort, die sie im Wirt induzieren. Dadurch ist die Expression des eingeführten Transgens nur transient und endet nach 3-4 Wochen. Die wiederholte Applikation der Vektoren gestaltet sich schwierig, da neben einer zellulären Immunantwort auch eine humorale Immunreaktion mit der Produktion von Antikörpern, die gegen das Adenoviruskapsid gerichtet sind, ausgelöst werden kann (Yang et al., 1994). Allerdings sollte dieser Umstand am Auge nur eine untergeordnete Rolle spielen, da es sich um ein immunprivilegiertes Organ handelt (Larkin et al., 1996) und eine systemische Anwendung durch *ex vivo*-Gentransfer vermieden werden kann.

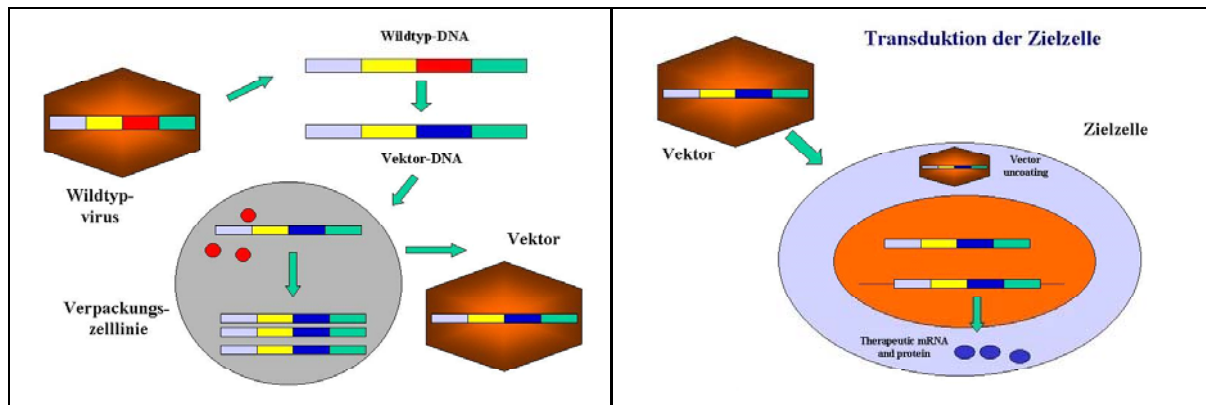


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung replikationsdefizienter, rekombinanter adenoviraler Vektoren und der Transduktion einer Zielzelle mittels dieser Vektoren (nach Kay et al., 2001).

### 1.2.6 Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) als Kandidat für die Verbesserung der prä-operativen Ausgangssituation kornealer Transplantate

Wachstumsfaktoren sind körpereigene Polypeptide, die vielfältige Wirkungen auf die Differenzierung, Morphologie und Funktion von Zellen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs ausüben. Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF-Familie) sind aus zahlreichen Geweben isoliert worden (Gospodarowicz et al., 1986, Houssaint et al., 1990). FGF beeinflusst wichtige Vorgänge auf zellulärer Ebene, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und –morphologie (Gospodarowicz et al., 1986). *In vitro*-Studien zeigen, dass besonders der saure und der basische FGF (aFGF bzw. bFGF) die Wundheilung des Hornhautepithels und -endothels durch Stimulierung der Zellproliferation und –migration beschleunigen (Gospodarowicz et al., 1977, Gospodarowicz und Greenburg, 1979, Landshman et al., 1987, Assouline et al., 1989, Hoppenreijds et al., 1994).

aFGF und bFGF sind zwei eng miteinander verwandte Mitogene, die eine absolute Homologie von 55 % aufweisen (Esch et al., 1985). aFGF-mRNA, Protein und seine Rezeptoren finden sich in der Kornea in Epithel- und Endothelzellen, jedoch nicht in stromalen Keratozyten (Caruelle et al., 1989, Wilson et al., 1994, Lovicu et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression von aFGF mit aktiver Migration in epithelialen Wundheilungsprozessen korreliert ist (Dabin und Courtois, 1991). In der Organkultur der humanen Hornhaut zeigte sich ebenfalls ein heilungsbeschleunigender Effekt von exogen zugegebenem bFGF nach Wundläsion (Schilling-Schön et al., 2000). Auch die Präsenz von endogenem bFGF in kornealen Endothelzellen spielt für die Migration dieser Zellen nach Wundläsion eine entscheidende Rolle. Erste Versuche weisen außerdem auf einen Apoptose-inhibierenden Effekt dieses Wachstumsfaktors hin. So konnte nach exogener Zugabe von

bFGF die Qualität von Hornhauttransplantaten nach Langzeitlagerung in serumfreiem Medium verbessert werden (Rieck et al., 2003). Arbeiten an retinalen Pigmentepithelzellen lassen erwarten, dass aFGF eine noch stärkere zellprotektive Wirkung vermittelt, als bisher von bFGF erreicht wurde (Prof. Courtois, Paris, persönliche Mitteilung).

### **1.2.7 Modulation der immun-vermittelten Transplantatabstoßung**

#### **1.2.7.1 Das Th1-/Th2-„Paradigma“**

Zytokine sind lösliche Mediatoren, die eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten spielen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen können je nach ihrer Zytokinsekretion und der nachfolgenden Effektorfunktion, z.B. in Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden (Mosmann und Coffman, 1989, Swain, 1995). Das Überwiegen von Th1- oder Th2-Antworten kann Einfluss auf Infektions- und Autoimmunkrankheiten nehmen, aber auch auf den Verlauf von Transplantationen. So gibt es Studien, die belegen, dass eine Akzeptanz von Transplantaten mit der erhöhten Produktion von Th2-Zytokinen einhergeht (Takeuchi et al., 1992, Sayegh et al., 1995). Eine Transplantat-Abstoßung ist eng mit der Expression von Th1-Zytokinen verbunden, während Th2-Zytokine dabei nur in geringen Mengen oder gar nicht gefunden werden (Dallman et al., 1991). Auch bei der Abstoßung kornealer Transplantate handelt es sich um einen CD4<sup>+</sup> Th1-vermittelten Prozess (Qian und Dana, 2001). *In vivo* führt die Depletion von CD4<sup>+</sup> und nicht von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper zu einem verlängerten Transplantatüberleben (He et al., 1991, Pleyer et al., 1995, Coupland et al., 1995). Zusätzlich zeigen Mäuse, deren CD4-Gen ausgeschaltet wurde, eine verminderte Fähigkeit zur Abstoßung von kornealen Transplantaten. Im Gegensatz dazu tritt bei Mäusen mit ausgeschaltetem CD8-Gen eine Abstoßungsrate auf, die der von Wildtyp-Mäusen entspricht (Yamada et al., 1999, Haskova et al., 2000, Yamada et al., 2001). Der Mechanismus, durch den korneale Allo-Transplantate abgestoßen werden, ist mit der Fähigkeit assoziiert, starke DTH-Antworten (Hypersensitivität des verzögerten Typs) auszubilden (Joo et al., 1995, Hedge und Niederkorn, 2000). Auch die Zytokine, die in der Kornea oder im Kammerwasser von abgestoßenen Transplantaten vorkommen, sind vom Th1-Typ (Yamagami et al., 1998, Sano et al., 1998, King et al., 2000).

Typische Th1-Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  sind für Zell-vermittelte Immunreaktionen verantwortlich. Zu den Th2-Zytokinen zählen IL-4, IL-5, IL-10, die die Regulation von humoralen Immunreaktionen beeinflussen.

In Toleranzmodellen kann, verglichen mit einer Abstoßungsreaktion, in den meisten Fällen eine verminderte Expression der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  beobachtet werden, während

die Rolle der Th-2 Zytokine umstritten ist, da einige Gruppen eine signifikante Erhöhung und andere eine schwache Expression von IL-4 und/oder IL-10 beschreiben (Nickerson et al., 1997, Piccotti et al., 1997). Wahrscheinlich ist, dass eine Beeinflussung der Immunantwort in Richtung Th2 teilweise zu einer Transplantatakzeptanz beitragen kann, ohne jedoch Toleranz zu induzieren.

#### **1.2.7.2 Interleukin-4 (IL-4)**

IL-4 gehört zu den Zytokinen, die die Proliferation, Maturation und Differenzierung von lymphoiden Zellen induzieren und koordinieren (Paul, 1991). In der Induktionsphase einer Immunantwort ist IL-4 für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th2-Zellen bedeutsam. Hohe *in vitro*-Konzentrationen von IL-4 können naive T-Lymphozyten (Th0-Zellen) in Richtung einer Th2-Antwort beeinflussen. Es nimmt somit eine zentrale Rolle bei der Induktion von Th2-Antworten ein (Abehsira-Amar et al., 1992). IL-4 wirkt auch auf B-Zellen und regt die Produktion von Immunglobulinen (IgG1 und IgE) und den Wechsel zwischen verschiedenen Ig-Isotypen an (Chomarat und Banchereau, 1997). Bei Monozyten und Makrophagen kann IL-4 die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen verringern, aktiviert jedoch gleichzeitig die Expression anderer Moleküle (MHC-II) und die anti- oder pro-inflammatorischen Effekte von IL-4 werden noch diskutiert (David et al., 1998, Goerdts und Orfanos, 1999).

IL-4 scheint wesentlich für die Akzeptanz von Transplantaten zu sein (Mottram et al., 1995). In dieser Rolle könnte die Produktion von IL-4 und IL-10 durch Th2-Zellen für die Hemmung der Th1-Funktion verantwortlich sein. Die Expression von IL-4 und die Abwesenheit von IL-2 sind wichtige Toleranzmarker (Nickerson et al., 1993), jedoch nicht ausreichend für die Induktion von Toleranz (Steiger et al., 1995).

#### **1.2.7.3 Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 kann ebenfalls eine Verschiebung von Th1- zu Th2-vermittelten Immun-Mechanismen verursachen (Cua et al., 1996). Es fördert die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, die große Mengen von IL-10 und TGF- $\beta$  sekretieren und so Immunantworten hemmen können (Groux et al., 1997). IL-10 wirkt indirekt herunterregulierend auf Th1-Zellen, da es die IL-12 Expression von APZ hemmt (Kennedy et al., 1994).

IL-10 wird von Th2-Zellen und Makrophagen produziert und spielt eine immunsuppressive Rolle durch Verminderung der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und MHC-II-Antigenen und der APZ-Zellfunktion (deWaal Malefyt und Moore, 1998). Diese Eigenschaften können auch bei systemischer Verabreichung beobachtet werden (deWaal

Malefyt et al., 1991, Fiorentino et al., 1991a, Fiorentino et al., 1991b), dafür muss IL-10 jedoch anhaltend und in hohen Konzentrationen vorliegen (Powrie et al., 1993).

Virales IL-10 (vIL-10) ist das IL-10-Homolog aus dem Epstein-Barr-Virus, das ähnliche anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt wie das zelluläre IL-10 von Säugetieren, aber die Th1-vermittelte Immunität hemmt, ohne gleichzeitig Th2-Antworten zu stimulieren (deVries, 1995).

#### **1.2.7.4 Gentransfer von IL-4 und IL-10 zur Modulation der Transplantatabstoßung**

Bei IL-4 und IL-10 handelt es sich um pleiotrope Zytokine, die verschiedene immunsuppressive und immunmodulierende Eigenschaften zeigen. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen sie vielversprechende Kandidaten für eine Überexpression in der lokalen Mikroumgebung von Transplantaten dar, um zu überprüfen, ob sie das Transplantatüberleben verlängern können. Gentransfer ist eine gute Möglichkeit, das Problem der kurzen Halbwertszeit von Zytokinen durch kontinuierliche Produktion über einige Zeit hinweg zu umgehen. Im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IL-4 zu einer deutlichen Verlängerung des Transplantatüberlebens führte (Kato et al., 2000). Andere Arbeiten konnten diesen Effekt nicht bestätigen (Smith et al., 1997, Mueller et al., 1997). Die Bedeutung von IL-10 für den Gentransfer ist weniger umstritten. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- $\beta$  und vIL-10 zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz in verschiedenen allogenen Herztransplantationsmodellen führt (Qin et al., 1995, Josien et al., 1998). Auch die Ko-Applikation von IL-4 und vIL-10 mit Hilfe rekombinanter Adenoviren konnte das Überleben allogener Nierentransplantate in einem starken Abstoßungsmodell signifikant verlängern (Kato et al., 1999), bei dem zuvor der IL-4-Gentransfer allein keinen Erfolg hatte.



## Aufgabenstellung

In vorangegangenen Studien konnte die bedeutende Rolle des Hornhautendothels für die Physiologie der Kornea belegt werden. Eine grundsätzliche Besonderheit dieser wichtigen Zellschicht ist die fehlende Zellteilungsaktivität, die durch normalen Zellverlust während des Alterungsprozesses oder nach Verletzungen zu einer Einschränkung der Sehfähigkeit führen kann. Auch bei Hornhauttransplantationen stellt diese Eigenschaft des Hornhautendothels ein großes Problem dar; so tritt ein Endothelzellverlust zum einen vor Transplantation bereits während der Hornhautkonservierung, zum anderen im Zuge von immun-vermittelten Abstoßungsreaktionen oder in Folge chronischer Vorgänge nach Keratoplastik auf. Dieser Verlust ist irreversibel und kann zur Eintrübung des Transplantats führen. Aus diesem Grund wird vor der Transplantation einer Kornea eine möglichst hohe Endothelzelldichte angestrebt. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss eines Wachstumsfaktors (aFGF) auf die Endothelzellfunktion und zweier Zytokine (vIL-10, rIL-4) auf die Beeinflussung von Immunreaktionen nach Keratoplastik untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte der Einsatz unterschiedlicher Gentransfer-Methoden an humanen kornealen Endothelzellen (HCEC) *in vitro* und *ex vivo* an Korneae der Ratte. Es sollten zwei grundlegende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist es möglich, die Proliferation der Endothelzellen durch Expression von aFGF zu induzieren und damit eine mögliche Rolle dieses Wachstumsfaktors zur Verbesserung der prä-operativen Ausgangssituation zu klären?
2. Kann durch die im Transplantat lokal und temporär überexprimierten Th2-Zytokine vIL-10 und rIL-4 eine Modulation der Immunreaktionen nach Keratoplastik erzielt werden, die ein längeres Transplantatüberleben ermöglichen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Methoden

#### 2.1.1 Klonierungsarbeiten mit dem aFGF-Plasmid

##### 2.1.1.1 Herstellung des aFGF-Plasmids

Das Plasmid p267, das die kodierende DNA-Sequenz für aFGF enthält, wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Courtois, INSERM U118, Paris zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Klonierungsarbeiten mit diesem Plasmid wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. R. Reszka, MDC, Berlin-Buch, durchgeführt. Die aFGF-cDNA wurde nach einer Restriktion mit den Enzymen *Xho* I und *Bgl* II in den Vektor pSLV-neo kloniert. Das Plasmid wurde vermehrt und mittels Restriktion und Sequenzierung überprüft. Die Restriktion erfolgte mit den Enzymen *Xho* I, *Bgl* II, *Bam* HI und *Hind* III. Die Agarosegelelektrophorese bestätigte die erwarteten Fragmente. Die Sequenzanalyse erfolgte nach Sanger et al., (1977). Bei der Sequenzierung der aFGF-cDNA stellte sich heraus, dass ein komplettes Triplet (AGG; entspricht R) fehlt. Damit war die aktive Form des Proteins in Frage gestellt. Um den Fehler zu beheben, wurde eine Reparatur-PCR durchgeführt. Der „repair“-Primer (5'-GCT TCT CGA GCC ACC ATG AAT TAC AAG AAG CCC AAA CTC CTC TAC TGT AGC-3') fügte hierbei das fehlende Triplet in die cDNA-Sequenz ein. Das resultierende Plasmid wurde vermehrt und sequenziert. Die Sequenzierung ergab diesmal die richtige Nukleotidabfolge, sodass für die nachfolgenden Experimente die Aktivität des aFGF gewährleistet war.

##### 2.1.1.2 Vermehrung des aFGF-Plasmids

###### 2.1.1.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen für Transformationen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Aus einem DH5 $\alpha$ -Glyzerol-Stock wurden mit einer sterilen Impföse 5ml LB-Medium beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit 1ml dieser Kultur wurden 100ml LB-Medium als Hauptkultur beimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10min auf Eis inkubiert und für weitere 10min bei 4000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10ml eiskaltem 0,1M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 5min auf Eis gehalten. Nach wiederholter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 2ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> + 10%

Glyzerol resuspendiert, in gekühlten und sterilen Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

#### **2.1.1.2.2 Transformation**

Mittels Transformation kann DNA in Bakterien übertragen werden. Die kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 140µl davon mit 5µl Plasmid gemischt und für weitere 30min auf Eis gehalten. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für genau 45sec, der die Aufnahme der DNA in die Zellen verbessern sollte. Die Zellen wurden 2min auf Eis abgekühlt, nachfolgend mit 1ml LB-Medium versetzt und 1h im Schüttler bei 37°C inkubiert. Auf LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin erfolgte das Ausplattieren von 50µl der transformierten Bakterien, die über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Von den gewachsenen Kolonien wurden Einzelkolonien gepickt, in 5ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Über einen Restriktionsverdau erfolgte die Analyse der Kolonien.

#### **2.1.1.2.3 Restriktionsanalyse**

Die DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten und konnte dadurch charakterisiert werden. Ein 20µl-Restriktionsansatz enthielt 0,1-2,0µg Plasmid-DNA, 2,0µl 10x Puffer, 2-5 Units des Restriktionsenzym (Bam HI) und eine dem Endvolumen entsprechende Menge an destilliertem Wasser. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte für 1h bei 37°C.

#### **2.1.1.2.4 Maxi-Präparation**

Der Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA in Mengen von bis zu 500µg diene der Maxi-Prep-Kit der Firma Genomed GmbH (Löhne).

Mittels einer 5ml Vorkultur wurden 200ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220rpm inkubiert. Die Bakterien wurden für 15min bei 5000rpm pelletiert und mit Hilfe der Lösungen des Genomed-Kits resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Die Plasmid-Reinigung und -Isolierung erfolgte über Säulen, nach Vorschrift des Kits.

Das DNA-Pellet wurde in 500µl A. dest. gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.1.1.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Als negativ geladenes Molekül aufgrund der Phosphatreste, wandert die DNA im elektrischen Feld zum positiven Pol. Je nach Größe der DNA-Fragmente, die in der Gelmatrix aufgetrennt

werden sollen, wurde ein 0,8-2,0%iges Agarosegel gegossen. Durch Erhitzen in TAE-Puffer wurde die Agarose geschmolzen, bevor sie beim Abkühlen und nach Zugabe von 20µg/ml Ethidiumbromid polymerisierte. Die DNA-Proben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer mit 1xTAE als Laufpuffer. Als Größenstandard dienten 500ng eines 1kb-Markers. Die angelegte Spannung betrug ca. 100V.

Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnte sie über einen Transilluminator mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Konzentration der DNA konnte anhand eines *Gel Imagers* und der Analyse-Software *E.A.S.Y.* (Herolab, Wiesloch) im Verhältnis zu den Größenstandards berechnet werden.

#### **2.1.1.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Neben der Quantifizierung mit dem *Gel Imager* kann die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung auch photometrisch mittels Spektralphotometer bestimmt werden. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die Konzentration konnte dann über Multiplikation des Absorptionswertes mit dem Faktor 50 für dsDNA in µg/ml errechnet werden ( $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$ ). Der Proteingehalt der Probe wurde bei einer OD von 280nm ermittelt. Lag das Verhältnis der Extinktion ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) bei einem Quotienten von 1,8-2,0, konnte von einer sauberen Probe, ohne Proteinverunreinigungen, ausgegangen werden.

### **2.1.2 Kultivierung der humanen kornealen Endothelzelllinie**

#### **2.1.2.1 HCEC-Zellkultur**

Die humane korneale Endothelzelllinie HCEC GVO 12/96L wurde von Herrn Dr. Bednarz und Frau Prof. Engelmann aus der Universitätsaugenklinik Hamburg Eppendorf etwa in der 100. Passage zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium diente DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und lediglich 2% FKS. Das serumreduzierte Medium sollte ein optimales Wachstum der Zellen verhindern und damit der Situation von Primärkulturen möglichst nahe kommen. Alle Versuche wurden mit Zellen von der 100. bis ca. 130. Passage durchgeführt.

### 2.1.2.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen und nach einem Gefrierschritt bei  $-80^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert. Das Einfriermedium enthält 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallisation von intrazellulärem Wasser und die damit verbundene Zerstörung der Zellmembranen durch die wasserbedingte Volumenzunahme verhindern kann. Da DMSO bei RT toxisch auf die Zellen wirkt, wurden alle Einfrierschritte auf Eis bzw. bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  erwärmt, tropfenweise in kaltes Kulturmedium überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in geeigneter Zelldichte in Kulturgefäße ausgesät.

### 2.1.3 Lipid-vermittelter Gentransfer in HCEC

#### 2.1.3.1 Transfektionen von HCEC

Die Übertragung von Fremd-DNA in die Zellen erfolgte mit Hilfe verschiedener kommerziell erhältlicher Transfektionsreagenzien auf Lipid-Basis. Bei Lipofectin, Lipofectamine, DMRIE-C, Cellfectin (Invitrogen) und DAC-30 handelt es sich um Liposomen, bei Superfect, Effectene (Qiagen) und FuGene6 (Roche) um nicht-liposomale Transfektionsreagenzien. Alle Transfektionen erfolgten nach Angaben der Hersteller. Um die Effizienz der Genübertragung von DAC-30 zu erhöhen, wurde Protaminsulfat (PS, 1mg/ml) 1:50 zugesetzt.

Tabelle 2: Eine Auswahl der verwendeten Transfektionsreagenzien und ihrer Helferlipide

Reagenz	Name / Helfer-Lipid
Lipofectin™	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammoniumchloride (DOTMA) / <i>DOPE</i>
DMRIE-C™	1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide (DMRIE) / <i>Cholesterol</i>
DAC-30	3β[N-(N,N'-dimethylaminoethan)-carbonyl]cholesterol / <i>DOPE</i>
FuGENE™6	Multi-Komponenten-Lösung auf Lipidbasis
Effectene™	nicht-liposomale Lipidlösung in Verbindung mit einem speziellen DNA-kondensierenden Enhancer

#### 2.1.3.1.1 Marker-Gentransfer

Um die besten Transfektionsbedingungen für jedes Reagenz zu bestimmen, wurden zunächst Markergene (*E. coli* β-Galaktosidase [β-gal], Enhanced Green Fluorescent Protein [EGFP]) in HCEC übertragen und die Effizienz des Gentransfers sowie die Toxizität der Reagenzien ermittelt. Lipide und Plasmid-DNA wurden in verschiedenen Konzentrationen und

Mischungsverhältnissen in ihrer Wirkung auf die Zellen ausgetestet. Von  $\beta$ -gal transfizierten Zellen wurden Fotos angefertigt und der EGFP-Gentransfer am Durchflusszytometer (FACS) charakterisiert.

#### **2.1.3.1.2 $\beta$ -Galaktosidase-Färbung**

Die Effizienz des  $\beta$ -Galaktosidase-Gentransfers wurde 24h nach Transfektion durch Färbung der transfizierten Zellen ermittelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in einer Formaldehyd[2%]/Glutaraldehyd[0,2%]-Lösung für 10min bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend in einer 1%igen X-gal-Lösung inkubiert. Nach 24h bei 37°C folgte ein weiterer Waschschrift und die Zellen konnten in PBS bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Dokumentation der Gentransfer-Effizienz wurden Fotografien angefertigt.

#### **2.1.3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse zur Ermittlung von Effizienz und Toxizität nach Gentransfer**

Fluoreszierende Zellen können mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS) untersucht werden. Es erfasst Farbstoffe, die das gleiche Anregungsspektrum besitzen (488nm), jedoch unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen. EGFP-transfizierte Zellen fluoreszieren grün (508nm) und lassen sich in der 1. Fluoreszenz messen. Eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) ist bei Zellen möglich, die ihre Membranintegrität verloren haben. PI weist eine besondere Affinität zu Nukleinsäuren auf und kann durch permeable Membranen in die Zelle diffundieren und dort die DNA rot anfärben. Dies lässt Rückschlüsse auf die Toxizität der Untersuchungen zu. Die rote, PI-vermittelte, Fluoreszenz (620nm) kann in der 2. und 3. Fluoreszenz gemessen werden. 24h nach Transfer des EGFP-Plasmids in HCEC mit Hilfe der verschiedenen Reagenzien in unterschiedlichen Versuchsansätzen, erfolgte die Quantifizierung der grün und rot fluoreszierenden Zellen. Die HCEC wurden hierfür trypsinisiert, pelletiert und in 200 $\mu$ l PI (50 $\mu$ g/ml in PBS) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 20min auf Eis unter Lichtausschluss. Bei der anschließenden FACS-Messung wurde parallel der prozentuale Anteil von grün (transfiziert) und rot (avital) fluoreszierenden Zellen pro Ansatz ermittelt. Daraus konnten direkt Rückschlüsse auf Effizienz und Toxizität der Versuche gezogen werden.

#### **2.1.3.2 Gentransfer von aFGF**

Anschließend erfolgte der Gentransfer des Fibroblasten-Wachstumsfaktors-1 (FGF-1, aFGF) unter den für jedes Transfektionsreagenz ermittelten optimalen Bedingungen. Nach der

Transfektion wurden die Zellen über eine Woche in Kultur gehalten und an den Tagen 4 und 7 mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in der Zählkammer quantifiziert.

#### **2.1.3.2.1 Raster-Elektronen-Mikroskopie**

Zur optischen Beurteilung der Morphologie der HCEC an den Tagen 4 und 7 nach aFGF-Gentransfer wurden in der Augenklinik von Frau Sänger elektronen-mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dazu wurden die Zellen vor der Transfektion in 24-Loch-Platten ausgesät, die 13mm Zell-Kultur Deckgläschen enthielten. An den Tagen 4 und 7 wurden die transfizierten Zellen in 2,5% Glutaraldehyd fixiert und in 2% Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend erfolgte ein Entwässerungs- und Trocknungsschritt in Alkohol und Hexamethyldisilazane. Die Deckgläschen, auf denen sich die Zellen befanden, wurden auf Prparatehalter aufgeklebt und mit Gold besprüht. Anschließend konnten die Aufnahmen angefertigt werden.

#### **2.1.4 Expressionsuntersuchungen auf Protein-Ebene**

##### **2.1.4.1 Zellyse**

Für den biochemischen Nachweis des aFGF-Proteins in den transfizierten Zellen, wurden diese lysiert. Dafür wurden die Gentransfer-Experimente in 6cm-Schalen durchgeführt, um ausreichend große Mengen an Zellextrakt für den Proteinnachweis zu gewinnen. An den Tagen 4 und 7 nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert, 1x mit PBS gewaschen und in 50ul kaltem Lysispuffer, der Proteinase-Inhibitoren enthielt, resuspendiert. Die Fragmente wurden erneut pelletiert und der die löslichen Zellproteine enthaltende Überstand gesammelt und bei -80°C eingefroren.

##### **2.1.4.2 Gesamtproteinbestimmung**

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte mit dem Micro-BCA-Protein Test der Firma Pierce. Damit können Proteinkonzentrationen von 0,5-20ug/ml erfasst werden. Dieser Test beruht auf der Eigenschaft von Proteinen, mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im alkalischen Milieu blaue Farbkomplexe zu bilden. Die photometrische Messung dieser Komplexe erfolgte bei 562nm. Untersucht wurde der Proteingehalt von aFGF-transfizierten HCEC. Um in dem Messbereich des Tests zu bleiben, mussten die lysierten Zellen 1:50 in PBS verdünnt werden. Über eine BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt, aus der der Proteingehalt der Proben direkt abgelesen werden konnte. Über die eingesetzte Probenmenge konnte die Gesamtproteinkonzentration in 1ml Probe ermittelt werden.

### **2.1.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Für die Auftrennung der Proteine wurden 100µg Gesamtprotein von jedem Zelllysate pro Geltasche aufgetragen. Zuvor wurde das entsprechende Lysatvolumen 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C aufgeköcht. Nach Beendigung des Gellaufs folgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran. Zur Überprüfung wurde diese nach dem Transfer in Ponceau-Lösung überführt, wobei die Proteinbanden rot angefärbt wurden. Nach dem Blocken (4°C ü.N. oder RT 1h) in 5% Milchpulver in TBST konnte die Antikörper-Färbung durchgeführt werden. Die Antikörper wurden in 3% BSA/TBST verdünnt, anti-aFGF 0,1 mg/ml, das Peroxidase-Konjugat 1:10 000. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 h. Nach einer abschließenden Spülung in TBST erfolgte die Entwicklung des Blots mit Hilfe des ECL-Assays von Amersham. Die entwickelte Membran wurde in eine Filmkassette eingelegt und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt.

### **2.1.5 Gentransfer in der Keratoplastik**

#### **2.1.5.1 Adenovirus-vermittelter Gentransfer**

Die adenoviralen Vektoren, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Thomas Ritter, Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, hergestellt.

Über homologe Rekombination der Zielgen-DNA aus dem rekombinanten pACCMV-Vektor in die E1-Region des adenoviralen Plasmids pJM17 entstanden während einer Ko-Transfektion mittels Kalzium-Phosphat in eine Verpackungszelllinie (911, 293) rekombinante Adenoviren, die jedoch außerhalb der Verpackungszelllinie replikationsdefizient sind. Rekombinante Adenoviren weisen aus Gründen der biologischen Sicherheit und zur Steigerung der Verpackungskapazität eine Deletion im, für die Virusreplikation wichtigen, E1-Leserahmen auf und sind damit nur in speziellen Verpackungszelllinien, die die adenoviralen E1A- und E1B-Proteine konstitutiv exprimieren, in der Lage, sich zu replizieren. Nach Überprüfung, Vermehrung und Aufreinigung im Cäsium-Chlorid-Gradienten konnten die adenoviralen Konstrukte in weiterführenden Studien eingesetzt werden. Folgende Konstrukte kamen in den Experimenten zur Anwendung: AdvIL-10, AdIL-4, AdEGFP, Adβ-gal und Ad dl 312 (Ad0). Nach persönlicher Mitteilung von Dr. Ritter konnten die Bioaktivitäten der Virus-kodierten vIL-10 (Dissertation von Frau Dipl.-Biol. Christine Brandt) und IL-4 Zytokingene nachgewiesen werden.



#### **2.1.5.1.1 Adenoviraler Marker-Gentransfer in HCEC**

Die Zellen wurden am Tag vor der Transduktion ausgesät, sodass sie für den adenoviralen Gentransfer eine Konfluenz von 80% aufwiesen. Pro Vertiefung wurden in 300µl DMEM mit 2% FKS 50-1000 plaque forming units (pfu) AdEGFP und zusätzlich 8µg/ml Polybren zur Erhöhung der Transduktionseffizienz pipettiert (Plaque forming unit ist ein Standard-Ausdruck für die Fähigkeit der hergestellten rekombinanten Viren, auf der Verpackungszelllinie infektiöse Plaques auszubilden). Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und die Zellen 24h später durchflusszytometrisch auf ihre GFP-Expression hin untersucht.

#### **2.1.5.1.2 Adenoviraler Gentransfer in *ex vivo* kultivierte Ratten-Korneae**

Aus dem Spendertier (Wistar-Furth Ratte) wurde mit Hilfe eines 3,5mm Trepanns die zentrale Hornhaut ausgestanzt und sofort in 24-Loch-Zellkulturplatten mit je 1ml DMEM ohne FKS überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Endothelzellschicht der Kornea nach oben zeigte. Das Medium wurde entfernt und gegen 500µl Transduktionslösung mit  $1 \times 10^8$  pfu/Kornea ausgetauscht. Dabei war es wichtig, dass die Hornhaut vollständig mit der Transduktionslösung bedeckt war. Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Lösung vorsichtig abgezogen und die Hornhaut dreimal zur Entfernung freier Viruspartikel gewaschen. Anschließend wurde die Kornea mit 500µl DMEM ohne FKS versetzt und weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten die Hornhäute entweder nach Zugabe von DMEM mit 2 % FKS und Amphotericin B (1:1000) weiter *ex vivo* kultiviert und der Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten zur Analyse der Zytokinproduktion entnommen werden, oder direkt der allogenen Hornhauttransplantation zugeführt werden.

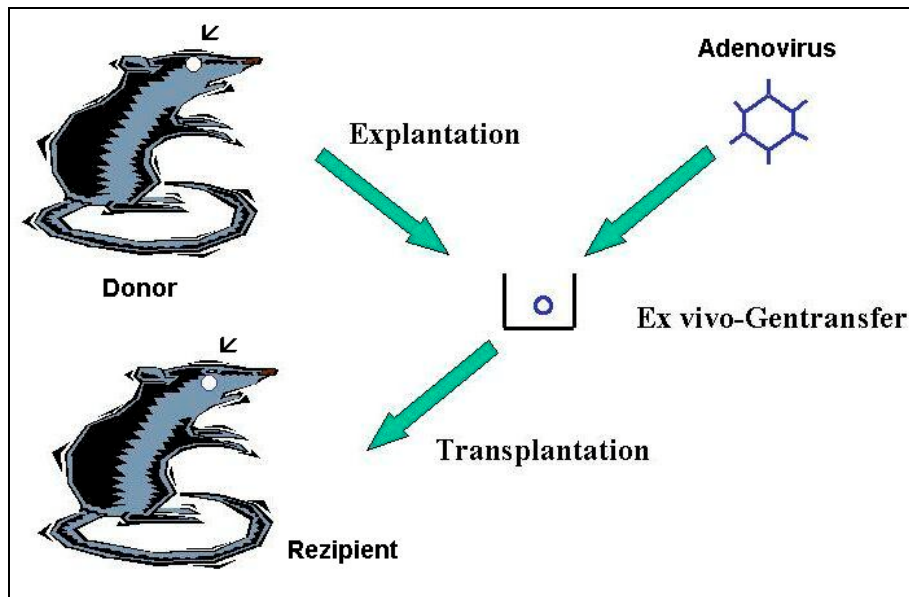


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Methode der *ex vivo*-Transduktion einer Rattenhornhaut aus: PD Dr. T. Ritter (Habilitationsschrift).

#### 2.1.5.2 Liposomaler Gentransfer in *ex vivo* kultivierte Ratten-Korneae

Zur Bildung der Transfektions-Komplexe wurde parallel zur Kornea-Entnahme das Liposom Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in verschiedenen Konzentrationen, 10µg Transferrin (Sigma) und 1µg des Plasmids pcDSRα-BCRF1 (PD Dr. Thomas Ritter, Berlin), das unter der Kontrolle eines SV40-Promotors für vIL-10 kodiert, zusammenpipettiert und mit serumfreiem Opti-MEM®-Medium auf ein Gesamtvolumen von 250µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde 30min zur Komplexbildung bei RT inkubiert. Die frisch entnommenen Hornhäute wurden mit PBS gespült und anschließend in jeweils 250µl Opti-Mem und Transfektionslösung aufgenommen.

Auch hier wurde darauf geachtet, dass die Hornhaut vollständig mit der Transfektionslösung bedeckt war. Nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Lösung vorsichtig abgezogen und die Hornhaut dreimal zur Entfernung der Komplexe gewaschen. Anschließend wurde die Kornea mit 500µl DMEM ohne FKS versetzt und weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten die Hornhäute entweder nach Zugabe von DMEM mit 2 % FKS und Amphotherizin B (1:1000) weiter *ex vivo* kultiviert und der Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten zur Analyse der Zytokinproduktion entnommen werden, oder direkt der allogenen Hornhauttransplantation zugeführt werden.

### **2.1.5.3 Untersuchungen zur Zytokinexpression mittels ELISA**

Zur Quantifizierung der Zytokinproduktion durch die adenoviral transduzierten oder liposomal transfizierten Hornhäute wurden die Überstände der Korneae zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gentransfer geerntet und mittels ELISA analysiert. Die Messung der vIL-10-Produktion erfolgte über den kommerziell erhältlichen ELISA-Kit der Firma Coulter-Immunotech (Hamburg). Der rIL-4-ELISA wurde am Institut für Medizinische Immunologie (Charité-Universitätsmedizin Berlin) in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. T. Ritter etabliert. Hierfür wurde ein aus OX-81 Hybridoma Zellen gewonnener anti-Ratten-IL-4 monoklonaler Antikörper (0,81mg/ml 1:500 in 0,1M Karbonatpuffer, 50µl/Loch) über Nacht bei 4°C an eine 96-Loch-Platte gebunden. Am nächsten Tag wurde der Beschichtungspuffer verworfen und die Platte mit 100µl Blockpuffer/Loch für 2h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden Standard (rekombinantes Ratten IL-4) und Proben in entsprechenden Verdünnungen mit 50µl/Loch aufgetragen und 2h schüttelnd bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach vier Waschschritten wurde der sekundäre Antikörper (anti-Ratten-IL-4-biotinyliert, 0,5mg/ml) 1:500 in Verdünnungspuffer zu je 50µl/Loch aufgetragen und für 1h inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschritten wurde Streptavidin-Peroxidase (0,64mg/ml) 1:2000 verdünnt und mit je 50 µl/Loch in die Vertiefungen pipettiert. Nach der einstündigen Inkubationszeit und den 4 Waschschritten wurden 50µl Substrat A+B (1:1) pro Vertiefung zugegeben und 30 min inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 1M Schwefelsäure (50µl/Loch) abgestoppt und die Extinktion bei 450nm gemessen.

### **2.1.5.4 Transplantation von Rattenhornhäuten**

Alle Tierversuche wurden nach den Anforderungen der „Guiding Principles in the Care of Animals“ des National Institute of Health, Bethesda und den Richtlinien der Senatsverwaltung Berlin, durchgeführt. Es wurde nur jeweils ein Auge transplantiert, sodass die Tiere auf der anderen Seite ihre Sehkraft behielten.

Die Korneatransplantationen der adenoviral transduzierten Hornhäute wurden von Frau MUDr. Klará Sedláková, die der liposomal transfizierten Hornhäute von Dr. Nianqiao Gong durchgeführt.

Für die Versuche wurden 8-10 Wochen alte, weibliche Ratten mit einem Gewicht von 200-250g verwendet. Es wurden Zuchtlinien verwendet, die sich in ihren MHC Klasse I und II Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden (Gill et al., 1987).

Das Spendertier (Wistar Furth, WF) wurde durch eine Inhalationsnarkose eines Gemischs von CO<sub>2</sub> und Lachgas in einer in der tierexperimentellen Anlage vorhandenen Einrichtung getötet.

Nachfolgend wurde mit einem 3,5mm Trepan die Hornhaut entnommen und *ex vivo* transduziert oder transfiziert. Das Empfängerauge wurde vor dem Eingriff mit 1% Atropin Sulfat weitgetropft, um Irisschäden während der Transplantation zu vermeiden. Die Empfängertiere erhielten eine intramuskuläre Injektion einer Kombination aus Ketavet (16,5 mg/Tier (200g)) und Rompun (0,7 ng/Tier (200g)) zur Anästhesie. Mit einem 3,0mm Trepan wurde aus dem Empfängertier die rechte Hornhaut ausgestanzt und die transduzierte Spenderhornhaut mittels durchgehender Naht eingesetzt. Um die Augenvorderkammer zu stabilisieren und Linsen- und Iris-Schädigungen zu vermeiden, wurde eine viskoelastische Substanz (Healon) eingebracht, die vor dem Verschluss der Wunde wieder entfernt wurde. Eine kleine Luftblase, die anschließend in die Vorderkammer eingebracht wurde, diente dazu, die frisch eingesetzte Kornea von der Iris zu trennen (Pleyer et al., 1995). Das Nahtmaterial verblieb bis zum Versuchsende im Auge. Die transplantierten Tiere wurden unter dem Operationsmikroskop dreimal innerhalb der ersten postoperativen Woche und anschließend täglich kontrolliert. Der Grad der Korneatrübung diente als Indikator für die Transplantat-Abstoßung. Bei einer Bewertungs-Skala von 0-4 galt eine Trübung von 3 oder höher als abgestoßen. Am Tag der Abstoßung bzw. 10 Tage post OP wurden bei einigen Gruppen das Transplantat, die drainierenden Lymphknoten und die Milzen entnommen. Die Transplantate wurden für die Histologie in OCT eingebettet. Mit Lymphknoten und Milzen wurde am Tag der Entnahme eine gemischte Lymphozytenkultur angesetzt.

Als Kontrollen dienten nicht-transduzierte allogene (WF) und syngene (Lewis, Lew) Hornhauttransplantate, sowie mit einem Adenoviruskonstrukt ohne therapeutisches Gen (Ad0) bzw. mit Ad $\beta$ -gal transduzierte syngene und allogene Hornhäute. In der Liposomenkontrollgruppe wurden Hornhäute verwendet, die nur mit dem Liposom und Transferrin, ohne Plasmid behandelt worden waren.

#### **2.1.5.5 Gemischte Lymphozytenkultur zur Überprüfung der Immunreaktionen im Transplantatempfänger**

##### **2.1.5.5.1 Lymphozytengewinnung und Ficoll-Gradient**

Für die gemischte Lymphozytenkultur wurden die drainierenden zervikalen Lymphknoten und die Milzen der Kornea-transplantierten Lewis-Ratten am Tag der Abstoßung bzw. am Tag 10 post OP entnommen und bearbeitet. Zunächst erfolgte die Isolation der Lymphozyten, indem die Lymphknoten durch Nylon-Zellsiebe (100 $\mu$ m und 40 $\mu$ m) gestrichen wurden. Die Lymphozyten wurden in PBS oder Medium gesammelt, zentrifugiert (1200rpm, 4°C, 5min) und in 3ml frischem PBS resuspendiert.

Die Milzen wurden durch ein grobes Metallsieb und anschließend durch ein 40µm Nylon-Zellsieb passiert, in PBS gewaschen und in 20ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 3ml Ficoll mit 4ml der Milzzellsuspension überschichtet (Pancoll Ratte: Dichte 1,091g/ml) und der Gradient bei Raumtemperatur und 370xg für 40min ausgebildet. Nach der Zentrifugation konnte der helle, die Lymphozyten enthaltende Ring in der Mitte des Gradienten abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt werden. Es folgten zwei Waschschrte mit Medium und vor der Färbung ein weiterer Waschschritt mit PBS, bevor die Zellen in 20ml PBS resuspendiert wurden.

Für die Präparation von Stimulatorzellen (allogene Wistar-Furth-Zellen und syngene Lewis-Zellen zur Stimulation über Donor-Antigene), schloss sich ein Bestrahlungsschritt zur Hemmung der Proliferation an, bei dem die Zellen 30 Gray ausgesetzt und anschließend bei -80°C eingefroren wurden.

#### **2.1.5.5.2 Färbung mit CFDA-SE (5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)**

Bei CFDA-SE handelt es sich um einen grün fluoreszierenden Membranfarbstoff, der bei Zellteilungen mit abnehmender Intensität an die Tochterzellen weitergegeben wird. Dies lässt sich per Durchflusszytometrie messen und erlaubt Aussagen über die Zellteilungsaktivität der stimulierten Lymphozyten. Die präparierten Lymphozyten wurden gezählt und anschließend mit 1ml 2,5µM CFDA-SE/1x10<sup>7</sup> Zellen für exakt 3min gefärbt. Nach der Färbung folgten drei Waschschrte mit Medium und ein erneutes Zählen, da bei der Färbeprozedur viele Zellen zugrunde gehen. Nach Ermittlung der endgültigen Zellzahl wurden die gefärbten Lymphozyten mit bestrahlten Stimulatorzellen (Lewis-Milz-Lymphozyten bzw. Wistar-Furth-Milz-Lymphozyten) ko-kultiviert. Dazu wurden je 3x10<sup>5</sup> Stimulator- und Responderzellen in 96-Loch-Rundbodenplatten in 200µl T-Zell-Medium mit 2% autologem (Lewis-) Serum pipettiert und für 4 Tage im Brutschrank kultiviert. Zur Gewinnung des autologen Serums wurde das kardial gewonnene Blut bei 4500 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und der so entstandene Serumüberstand abgenommen. Am Tag 1 nach Versuchsansatz folgte die Einstellung der zu analysierenden Proben am FACS-Gerät.

#### **2.1.5.5.3 FACS-Analyse zur Messung der Lymphozyten-Proliferation**

Durch Färbung mit CFDA-SE sollten Unterschiede in den Immunreaktionen zwischen den verschiedenen Transplantationsgruppen sichtbar gemacht werden. Die Antikörperfärbung gegen TCR und die Isotypenkontrolle wurden gemäß den Herstellerangaben für die Färbung eingesetzt. Die Antikörperfärbung erfolgte nach sorgfältigem Durchmischen der Proben bei

4°C für 15 min. Die Messungen wurden an einem FACS*Sort* Durchflusszytometer (Becton Dickinson) durchgeführt und mit Hilfe der *Cellquest*-Software (Becton Dickinson) ausgewertet. Aufgrund der Vielzahl der Messungen und der natürlich bedingten Abweichungen im biologischen System wurden für die Auswertung der FACS-Messungen individuelle „Gates“ gesetzt (nach Rücksprache mit Herrn PD Dr. F. Kern, Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin).

#### **2.1.5.6 Histologie**

Sämtliche histologischen Untersuchungen wurden von Frau Nadine Schmidt durchgeführt und sind Bestandteil ihrer Dissertation zum Dr. med.. Die Hornhäute der Ratten wurden an den Tagen 10, 17 und 24 nach Transplantation entnommen, OCT-fixiert und kryokonserviert. Nach Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex-Methode die monoklonale Antikörperfärbung für CD4, CD8, CD25, CD45, NK-Zellen und Monozyten. In dieser Arbeit sind nur die Färbungen für CD4 und CD8 dargestellt.

#### **2.1.6 Statistische Auswertung**

Alle Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte plus/minus Standardfehler (standard error mean, SEM) dargestellt. Die Angabe der mittleren Überlebenszeit nach Transplantation erfolgte als Median. Aussagen zur statistischen Signifikanz wurden nach Anwendung des Student's T-Tests bzw. nach Berechnung von Chi-Quadrat Werten während der postoperativen Nachbeobachtungszeit getroffen (Log-Rank-Test).

### **2.2 Materialien**

Die Chemikalien für die Lösungen wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, D), Fluka (Deisenhofen, D), Serva (Heidelberg, D), Merck (Darmstadt, D), Boehringer (Mannheim, D), Gibco BRL (Gaithersburg, USA), Riedel-de Haen (Seelze, D), Baker (Deventer, NL), Invitrogen (Groningen, NL), DIFCO (Detroit, USA), Heraeus (Osterode, D), Pharmacia (Uppsala, S), AGS (Heidelberg, D) und Sigma (Deisenhofen, D) bezogen.

#### **2.2.1 Lösungen und Puffer**

##### **2.2.1.1 Puffer für Plasmidpräparation**

Puffer 1	25mM Tris, pH 8,0 10mM EDTA
Puffer 2	0,2M NaOH 1% SDS
Puffer 3	3M Natriumacetat, pH 5,5

### 2.2.1.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	10mM Tris-Base 1mM EDTA 1,6mM Eisessig
6xLadepuffer	0,25% Bromphenolblau 40% Sucrose in H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromid-Stammlösung DNA-Marker	10mg/ml in H <sub>2</sub> O 50 µl 1kb-Marker 100µl Ladepuffer 350µl TAE-Puffer

### 2.2.1.3 Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zell-Lysispuffer	100mM Tris 0,9% NaCl 5mM EDTA 1% Triton X-100 Proteaseinhibitoren
SDS-Page-Laufpuffer	3,0285 g/l Tris-Base 14,64 g/l Glycin 1 g/l SDS
Probenpuffer	10% Glycerin 5% β-Mercaptoethanol 3% SDS 125mM Tris-HCl pH 6,8 0,6% Bromphenolblau Proteaseninhibitoren

Tabelle 3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel in den verwendeten Konzentrationen.

	Trenngel 15%	Sammelgel 5%
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid Stammlösung	3,0 ml	0,33 ml
1,88M Tris/HCl pH8,8	1,2 ml	
0,625M Tris/HCl pH 6,8		0,4 ml
0,5% SDS	1,2 ml	0,4 ml
A. dest	0,6 ml	0,87 ml
TEMED	5 µl	2 µl
APS 10%	30 µl	10 µl

Multicolored Protein Markers

NEN®Life Science Products, Boston, MA, USA

### 2.2.1.4 Puffer für Western-Blot

Transfer-Puffer	3,0285 g/l Tris-Base 11,265 g/l Glycin 10% Methanol pH 8,3
TBST (10x)	320 g/4l NaCl 96,8 g/4l Tris-Base 40 ml/4l Tween-20 pH 7,6

Milchpulver	5 % in TBST
Ponceau S Lösung	Sigma, St. Lois, MO, USA

### 2.2.1.5 Puffer für IL-4 ELISA

Beschichtungspuffer	0,14% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,3% NaHCO <sub>3</sub>
Blockpuffer	20 ml/l Tris, 0,1 M, pH 7,5 29,22 g/l NaCl (0,9 %) 1 ml/l Tween 20 (0,1 %) +1:10 Genosys (Pharmingen)
Waschpuffer	41,25g/5 l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 5,5 g/5 l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 438,5 g/5 l NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,4
Streptavidin-POD Substrat A+B Verdünnungspuffer (Diluent)	Biosource, Camarillo, CA, USA Pharmingen, San Diego, CA, USA Pharmingen, San Diego, CA, USA
Stopplösung	1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 2.2.1.6 Lösungen für β-Galaktosidase-Färbung

Stocklösungen:	Ferricyanide/Ferrocyanide Stocklösung (je 125mM in A.dest) 1:1 Mischung von 250mM K <sub>3</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ) und K <sub>4</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ) in A.dest  1M MgCl <sub>2</sub> in A.dest  50mg/ml X-gal in DMSO
Fixierlösung:	2% Formaldehyd (Stocklösung 37%) 0,2% Glutaraldehyd (Stocklösung 25%) in PBS
Färbelösung:	19,3 ml PBS 40μl MgCl <sub>2</sub> 400μl Ferri/Ferro-Lösung 200μl X-gal (in DMSO)

### 2.2.1.7 Lösungen für MLR

T-Zell-Medium:	1% Natriumpyruvat 10% FKS 2% autologes Rattenserum (Lew) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Glutamin 0,4% β-Mercapto-Ethanol (Stock: 1:1000 in DMEM) in DMEM
L-NMMA Pancoll Rat	Alexis, Carlsbad, CA, USA PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D



### 2.2.1.8 Lösungen für FACS-Analyse

FACS-Puffer:	2% FKS 0,1% Natriumazid in PBS
FACS Flow	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS Clean	Becton Dickinson, San Jose, USA

### 2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Propidium Iodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
5-(and-6)-CFDA-SE	Molecular Probes, Leiden, NL

### 2.2.3 Antikörper

anti-rat $\alpha, \beta$ TCR mAb PE	Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-goat IgG (Rabbit) PO-Konjugat	Calbiochem, San Diego, CA, USA
anti-aFGF-goat IgG-Antikörper	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
anti rat IL-4 mAb	
(aus Ox-81 Hybridoma-Zellen gewonnen)	ECACC, Salisbury, UK
anti-rat IL-4-biotinyliert	Pharmingen, San Diego, CA, USA

### 2.2.4 Transfektionsmaterialien

Lipofectin <sup>®</sup> Reagenz	Invitrogen, Life technologies, Karlsruhe, D
LipofectAmine <sup>™</sup> Reagenz	Invitrogen, Life technologies, Karlsruhe, D
DMRIE-C Reagenz	Invitrogen Life technologies, Karlsruhe, D
CellFectin <sup>®</sup> Reagenz	Invitrogen Life technologies, Karlsruhe, D
Effectene <sup>™</sup>	Qiagen, Hilden, D
Superfect	Qiagen, Hilden, D
FuGene <sup>™</sup> 6	Roche, Mannheim, D
Lipofectamine <sup>™</sup> 2000	Invitrogen Life technologies, Karlsruhe, D
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polybren	Sigma, Steinheim, D
Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, D
Opti-MEM <sup>®</sup>	Gibco/Invitrogen, Life technologies, Karlsruhe, D

### 2.2.5 DNA-Vektoren

p267aFGF	Prof. Y. Courtois, Paris
pEGFP-N1	PD Dr. T. Ritter, Berlin
pcDNA $\beta$ gal	PD Dr. T. Ritter, Berlin
pcDSR $\alpha$ -BCRF1	PD Dr. T. Ritter, Berlin

### 2.2.6 Adenovirale Konstrukte

AdvIL-10	PD Dr. T. Ritter, Berlin
AdIL-4	PD Dr. T. Ritter, Berlin
Ad dl 312 (Ad0)	Dr. J.K. Kolls, New Orleans, LO, USA
AdEGFP	Dr. A. Flügel, Martinsried
Ad $\beta$ -gal	Dr. J.K. Kolls, New Orleans, LO, USA

### 2.2.7 Proteine

rekombinantes humanes aFGF	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
----------------------------	--------------------------------

bovines aFGF	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
	Sigma, St. Lois, MO, USA
rekombinantes rat IL-4	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
	Biosource, Camarillo, CA, USA

### 2.2.8 Elektronenmikroskopie

Glutaraldehyd 25% in Wasser	Boehringer Ingelheim Bioproducts, Ingelheim, D
Osmiumtetroxid 2%	Paesel und Lorei GmbH & Co, Hanau, D
Hexamethyldisilazane	Sigma, Deisenhofen, D
13mm Zell-Kultur Deckgläschen,	Nunc, Roskilde, DK

### 2.2.9 Transplantationsmaterialien

Rompun (Xylazin)	BayerVital, Leverkusen, D
Ketavet (Ketamin)	Parke Davis GmbH, Freiburg, D
Atropin-Sulfat-Tropfen 1%	Ciba Vision, Wefling, D
Healon™	Pharmacia, Erlangen, D
Ofloxacin, Floxal™	Mann Pharma GmbH, Berlin, D
Nahtmaterial 11-0 Mersilene	Alcon, Freiburg, D

3,5 und 3,0mm Trepan, Hornhaut-Scheren

### 2.2.10 Biologische Materialien

#### 2.2.10.1 Zelllinien und Medien

DH5α:	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> Stratagene, Heidelberg, D
-------	---

LB-Medium:	10g Bactotrypton, 5g Yeast Extract, 5g NaCl, H <sub>2</sub> O ad 1l
------------	--

LB-Agar:	15g/l Agar in LB-Medium
----------	-------------------------

Nach Autoklavieren und Abkühlen kann das entsprechende Antibiotikum (Stammlösung 100mg/ml) in einer Konzentration von 100µg/ml hinzugefügt werden.

Humane korneale Endothelzelllinie immortalisiert durch SV40 T-Antigen	Dr. J. Bednarz, Hamburg
---	-------------------------

DMEM:	1% Glutamin 1% Pen/Strep 1% Natriumpyruvat 2% FKS
-------	--

für Hornhäute zusätzlich Amphotericin B 1:1000

#### 2.2.10.2 Versuchstiere

Inzucht-Ratten, weiblich, 200-250g, mit komplettem MHC-Mismatch  
Lewis (LEW/RT1<sup>l</sup>)

Wistar-Furth (WF/RT1<sup>u</sup>)

M&B, Ry, DK  
Charles River, Bad Sulzfeld, D  
M&B, Ry, DK  
Harlan Winkelmann, Borcheln, D

### 2.2.11 Versuchssysteme (Kits) und Enzyme

Plasmid-Präparations-Kit <i>Jet Star</i>	Genomed, Gaithersburg, USA
Restriktionsendonukleasen, Puffer	Pharmacia, Uppsala, S
Restriktionsendonukleasen mit 5-Buffer-System	AGS, Heidelberg, D
BCA-Kit	Pierce, Rockford, USA
RNase A	Boehringer-Mannheim, D
ECL™Detection Reagents	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
vIL-10 ELISA Kit	Coulter-Immunotech, Hamburg, D

### 2.2.12 Verbrauchsmaterialien

1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml Pipetten	Greiner, Nürtingen, D
verstellbare Pipetten mit Spitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorfgefäße: 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg, D
Einfrierampullen	Greiner, Nürtingen, D
Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde, DK
Polypropylenröhrchen 15, 50ml	Falcon, Oxnard, USA
Einmalspritzen 5, 10ml	Braun, Melsungen, D
Einmalkanülen	Braun, Melsungen, D
Sterilfilter 0,2µm	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Sephadex-Säulchen	Pharmacia, Uppsala, S
Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Blotfolie Hybond™ECL™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Maxisorb ELISA-Platten	Nunc, Roskilde, DK
96-Loch-Rundbodenplatten Nunclon™ Surface	Nunc, Roskilde, DK
96-Loch-Zellkulturplatten	Falcon, Oxnard, USA
24-Loch-Zellkulturplatten	Falcon, Oxnard, USA
6-Loch-Zellkulturplatten	Falcon, Oxnard, USA
Zell-Sieb 40µm Nylon	Falcon, Oxnard, USA
Zell-Sieb 100µm Nylon	Falcon, Oxnard, USA
Cellstar TC-Röhrchen 14ml	Greiner, Nürtingen, D
5ml Polystyren-Röhrchen	Falcon, Oxnard, USA
Polypropylen-Röhrchen Linbro® Liquisystem™	ICN Flow, Whippany, NJ, USA
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg, D
Deckgläschen 20x26mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D

### 2.2.13 Geräte, Messgeräte

Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Berlin, D
Brutschrank IG 150	Jouan, Unterhaching, D
Elektronen-Mikroskop Zeiss DSM 982 Gemini	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Electrophoresis Power Supply 200	Pharmacia, Uppsala, S
ELISA-Reader	Dynatech MRW Laboratories, Michigan, USA
FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg, D
<i>Gel Imager &amp; E.A.S.Y. Enhanced Analyses System</i>	Herolab, Wiesloch, D
Hyperkassette™	Amersham Life Science, Arlington Hts., IL, USA
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf, D
pH-Meter MultiCal	WTW, Weilheim, D
Protein-Gelelektrophorese-Kammer	AGS, Heidelberg, D
Schüttler	GFL, Burgwedel, D
Spectrophotometer 4053 Kinetics netraspec K	LKB Biochrom, Camebridge, GB
Stromversorgungsgerät EPS 500/400	Pharmacia LKB, Freiburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge GR 422	Jouan, Unterhaching, D

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nicht-viraler Gentransfer in humane korneale Endothelzellen

##### 3.1.1 Optimierung der Gentransfer-Bedingungen für HCEC

###### 3.1.1.1 Beta-Galaktosidase ( $\beta$ -gal)-Test

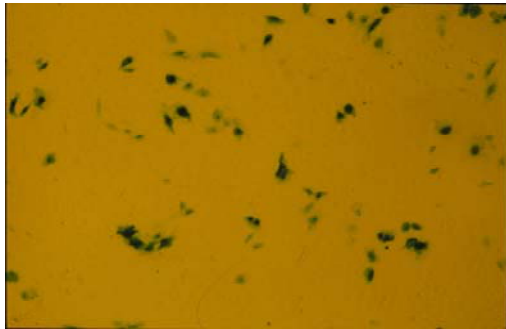
Für die Transfektion der HCEC standen acht verschiedene, kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien (TR) auf Lipid-Basis zur Verfügung (Lipofectin, Lipofectamine, DMRIE-C, Cellfectin, FuGene6, Effectene, Superfect, DAC-30). Für jedes Reagenz musste zunächst geprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen es für die Transfektion der HCEC geeignet ist. Die Zellen wurden dazu am Vortag der Transfektion in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/ml in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Transfektion hatten sie eine Konfluenz von 40-60% erreicht, die laut Herstellerangaben für den Einsatz aller verwendeten TR erforderlich war. Es folgte die Transfektion der Zellen mit dem Markergen  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) in verschiedenen Konzentrationen der TR und unterschiedlichen Lipid:DNA-Ratios, die vom Hersteller empfohlen wurden. Tabelle 4 zeigt die für jedes TR getesteten Bedingungen.

Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Transfektionsreagenzien (TR). Die Konzentrationen und Lipid:DNA-Ratios für die einzelnen TR wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt und für HCEC optimiert.

Lipid-Name	Abkürzung	Plasmid-Konzentration	Lipid:DNA-Ratio
Lipofectin	LF	0,3-10 $\mu$ g	6,25:1
Lipofectamine	LFA	0,3-10 $\mu$ g	6,25:1
DMRIE-C	DM	0,3-10 $\mu$ g	6,25:1
Cellfectin	CF	0,25-7,5 $\mu$ g	6,25:1
Fugene	FU	0,3-12 $\mu$ l	3:2; 3:1; 6:1
Effectene	EF	1-20 $\mu$ g	10:1; 25:1; 50:1
Superfect	SF	3-60 $\mu$ g	3:2; 3,75:1; 7,5:1
DAC-30	DAC	0,2-10 $\mu$ g	2:1; 5:1; 10:1
DAC-30 mit Protaminsulfat	DPS	0,2-10 $\mu$ g	2:1; 5:1; 10:1

24h nach Transfektion, erfolgte die Färbung der  $\beta$ -gal-transfizierten Zellen sowie die Anfertigung lichtmikroskopischer Fotografien. Anhand dieser Abbildungen konnte die

Effizienz der Markergen-Transfektion, ebenso wie eine eventuelle Toxizität der verwendeten Lipide abgeschätzt werden (Abb. 8).



**Lipofectin 1,25µg 6,25:1**



**DMRIE-C 2,5µg 6,25:1**



**DAC + PS 1µg 10:1**



**DAC 1µg 10:1**



**Kontrolle**

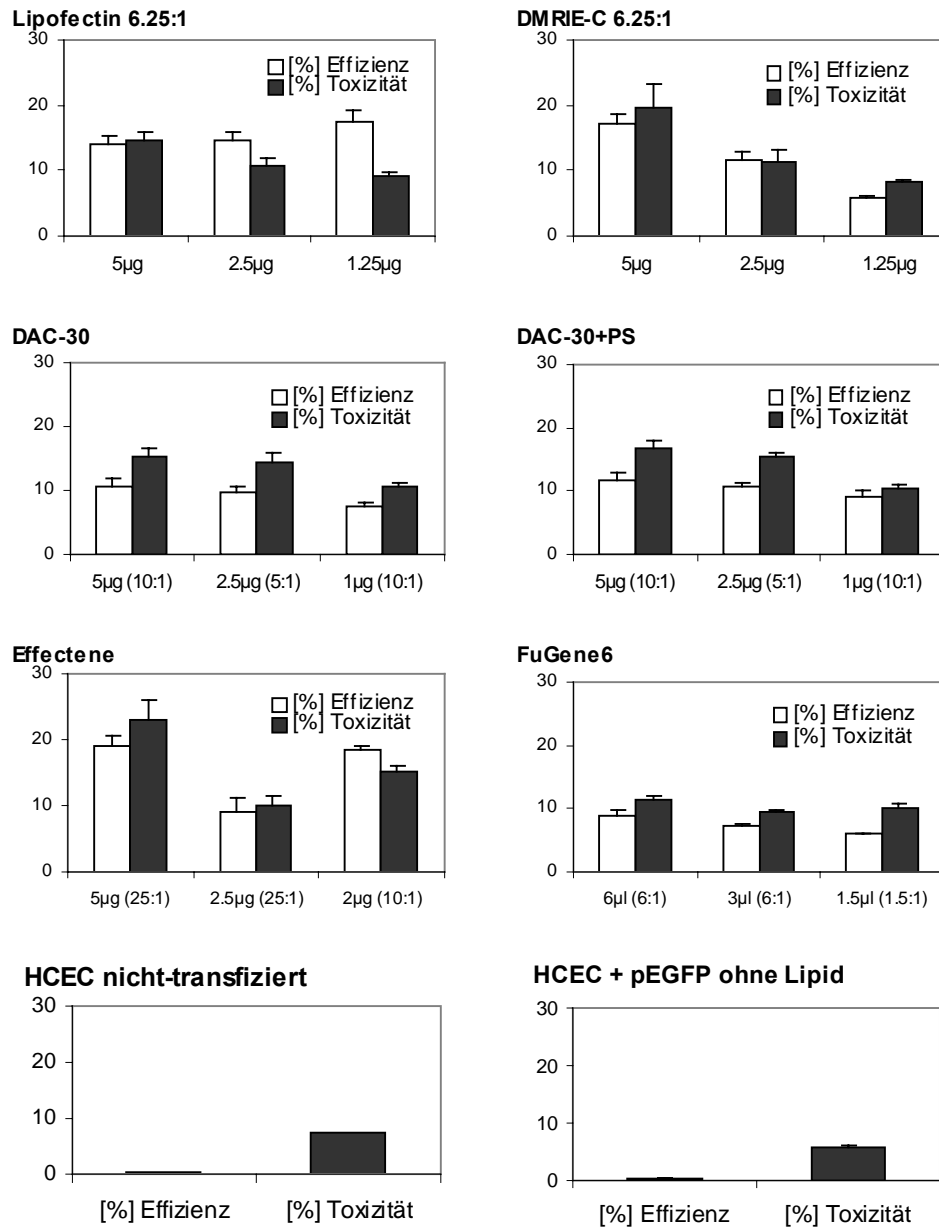
**Abbildung 8: Transfektion von HCEC mit  $\beta$ -gal und ausgewählten Lipiden.** Gezeigt sind Darstellungen von einem repräsentativen Experiment, mit den verwendeten Lipid-Konzentrationen und Lipid:DNA-Ratios.

### **3.1.1.2 Durchflusszytometrie zur exakten Bestimmung von Effizienz und Toxizität der verwendeten Lipide**

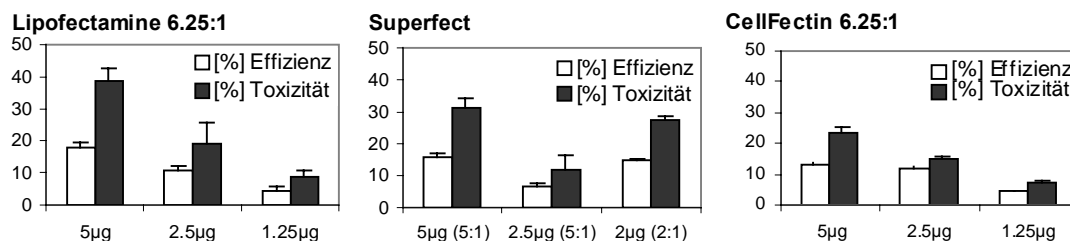
Anhand der  $\beta$ -gal-Experimente konnte eine Vorauswahl für geeignete Transfektionsbedingungen eines jeden Lipids getroffen werden. Jeweils drei Lipid-Konzentrationen bzw. Lipid:DNA-Ratios wurden für den Markergentransfer mit EGFP ausgewählt (Abb. 9). Da EGFP-transfizierte Zellen grün fluoreszieren, kann am FACS-Gerät

der prozentuale Anteil der transfizierten Zellen bestimmt werden. Um gleichzeitig eine Aussage zur Toxizität zu erhalten, wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung mit Propidium-Iodid behandelt, welches avitale Zellen rot fluoreszieren lässt. So konnte in einem Messgang der Einfluss der eingesetzten TR auf die HCEC bezüglich Effizienz und Toxizität der Transfektion ermittelt werden (n=6) (Abb. 9).

A



B



**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Ermittlung von GFP-positiven (Effizienz) und avitalen Zellen (Toxizität).** Dargestellt ist der prozentuale Anteil von GFP-positiven und PI-gefärbten Zellen bei verschiedenen Konzentrationen und Lipid:DNA-Ratios der einzelnen TR. Nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrollen. (A)

zeigt die für die weiteren Versuche genutzten TR, in (B) sind die drei TR dargestellt, die aufgrund ihrer hohen Toxizität für die weiteren Versuche nicht mehr verwendet wurden (n=6).

Aus den erhaltenen Daten wurden nun die optimalen Transfektionsbedingungen für jedes TR ausgewählt. Ausschlaggebend war eine geringe Toxizität, verbunden mit möglichst hoher Effizienz, nicht jedoch die höchste Effizienz, die von den TR erreicht wurde. Dies scheint für klinische Ansätze sinnvoller, da in jedem Fall möglichst viele Zellen des Hornhautendothels erhalten bleiben sollen. Unter diesen Voraussetzungen wurden folgende Lipid-Konzentrationen und Lipid:DNA-Ratios ausgewählt:

Tabelle 5: Zusammenfassung der ermittelten optimalen Lipidkonzentrationen und Lipid:DNA-Ratios, einschließlich der damit erreichten Effizienzen und Toxizitäten der getesteten Transfektionsreagenzien.

Lipid	Konzentration	Ratio	Effizienz	Toxizität
LF	1,25 µg	6,25:1	17 %	9 %
DM	2,5 µg	6,25:1	11 %	11 %
FU	6 µl	6:1	9 %	11 %
EF	2,5 µg	25:1	9 %	10 %
DAC	1 µg	10:1	7 %	10 %
DPS	1 µg	10:1	9 %	10 %
N			0 %	7 %

Da die unbehandelten Zellen (N) einen normalen Zellverlust von 7% aufwiesen, wurde dieser Wert von den Toxizitäten der mit Lipiden behandelten Zellen abgezogen, sodass eine Lipid-verursachte Toxizität von ca. 3% für die behandelten Zellen resultierte.

Lipofectamine, Cellfectin und Superfect zeigten extrem hohe Toxizitäten, sodass diese TR als ungeeignet für die Transfektion von HCEC eingestuft und von den weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden (Abb. 9).

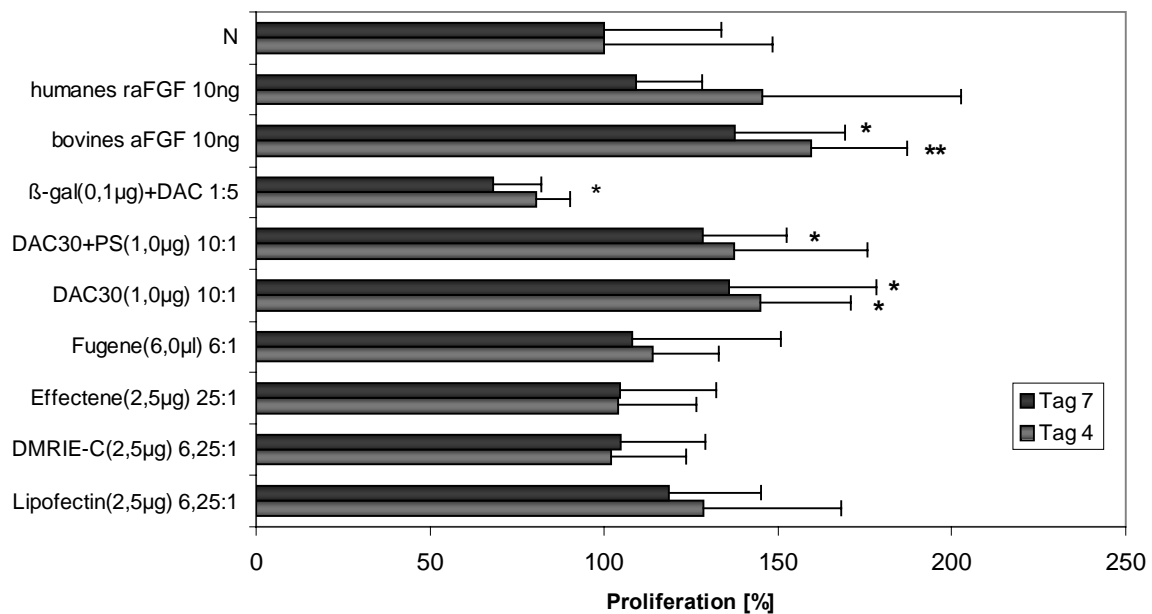
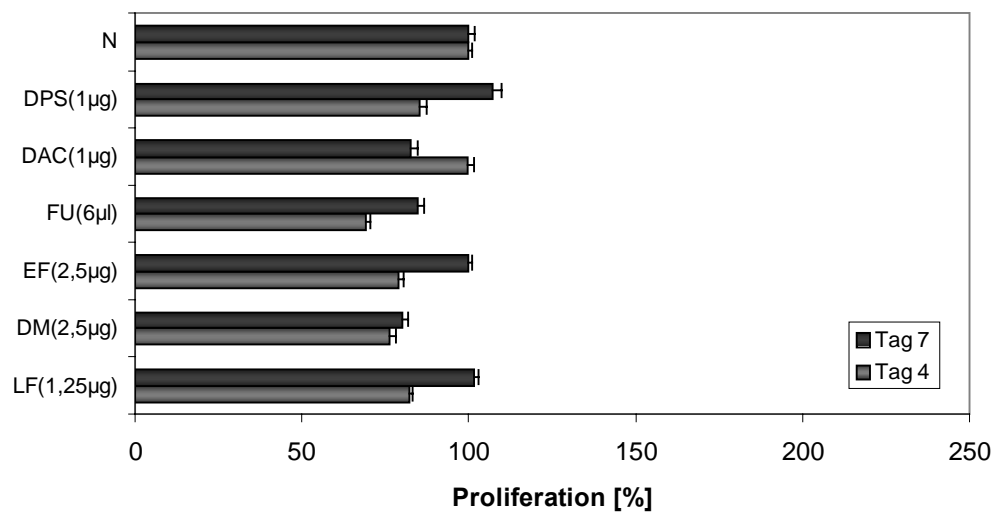
Es zeigte sich, dass bei allen TR, außer bei Lipofectin, in Abhängigkeit von der Lipid:DNA-Ratio, mit steigenden Lipid-Konzentrationen die höchsten Gentransfer-Effizienzen erreicht wurden, die jedoch mit hoher Toxizität verbunden waren. Bei Effectene erhöhte sich die Toxizität mit abnehmender Lipidkonzentration und geringerer Lipid:DNA-Ratio, ebenso wie die Effizienz. Lipofectin erreichte als einziges TR die höchste Effizienz mit gleichzeitig abnehmender Toxizität, wenn Lipid- und DNA-Konzentration verringert wurden.



### **3.1.2 Proliferationsanalyse der HCEC nach Gentransfer von aFGF**

Da Hornhaut-Endothelzellen normalerweise nicht oder nur in geringem Maße proliferieren, sollte überprüft werden, ob und wie stark die Expression des Wachstumsfaktors aFGF durch die Zellen, ihre Proliferation steigern kann.

Dazu wurden die zuvor bestimmten optimalen Transfektionsbedingungen für jedes TR eingesetzt. Um die Zellproliferation zu testen, wurden die Zellen am 4. und 7. Tag nach Transfektion gezählt. Die ermittelten Zahlen wurden prozentual bezogen auf nicht-transfizierte Kontroll-Zellen dargestellt (Abb. 10). Als Positivkontrollen dienten mit jeweils 10 ng/ml bovinem und humanem rekombinanten aFGF behandelte HCEC. Als Negativ-Kontrolle wurden HCEC, transfiziert mit pcDNA- $\beta$ gal ausgezählt.

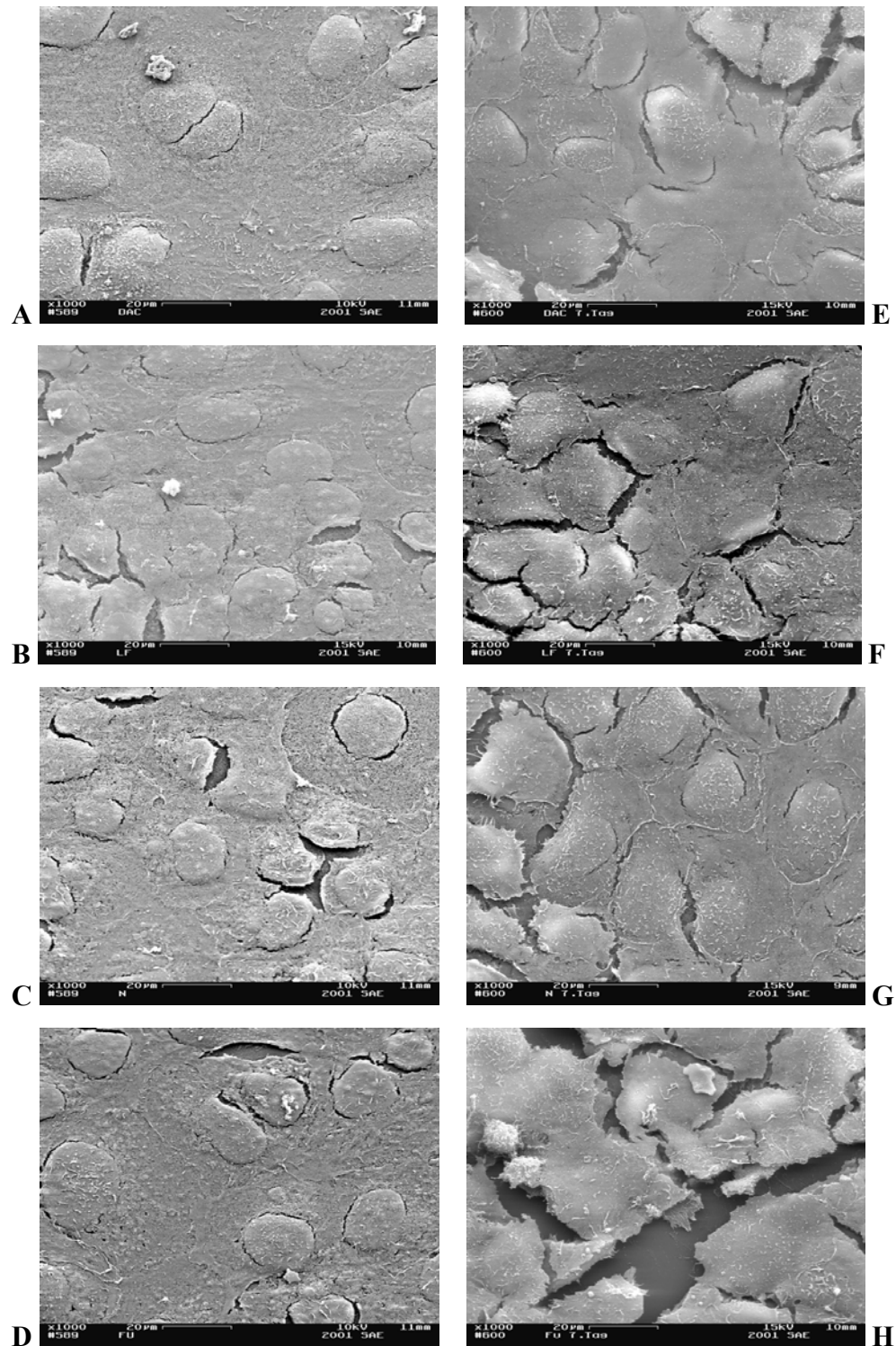
**A****B**

**Abbildung 10: Proliferation von HCEC nach Transfektion mit dem aFGF-Expressionsvektor und verschiedenen Transfektionsreagenzien.** (A) Zellen, die mit DAC-30 transfiziert wurden, zeigen den stärksten proliferativen Effekt, gefolgt von DAC-30 + PS und Lipofectin (n=11). Nahezu keine Proliferationssteigerung ist nach Gentransfer mit Fugene, Effectene und DMRIE-C ersichtlich (n=11). Exogene Zugabe von humanem rekombinantem (n=6) und bovinem aFGF (n=13) diente mit 10ng/ml als Positivkontrolle in nicht-transfizierten Zellen. Mit β-gal-transfizierte Zellen (n=5) als Negativkontrolle. (B) zeigt als weitere Kontrolle die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Lipiden ohne Plasmid (n=5). N=nicht-transfizierte Zellen (n=9); Signifikanz: \*p<0,05, \*\*p<0,006 bezogen auf nicht-transfizierte Zellen.

Die Unterschiede der erreichten und ausgewählten Gentransfer-Effizienzen (7-17 %) und Toxizitäten (3 %) zwischen den einzelnen TR waren relativ gering. Trotzdem zeigten sich nach aFGF-Gentransfer signifikante Unterschiede im Proliferationsverhalten der transfizierten HCEC (Abb.10). Interessanterweise steigerte DAC-30/aFGF-Gentransfer die Zellproliferation um 45 % an Tag 4 und um 35 % an Tag 7 nach Transfektion, obwohl dieses Lipid die niedrigste Gentransfer-Effizienz (7 %) erreichte. Mit DAC-30 + PS (40 % Tag 4; 30 % Tag 7) und Lipofectin (30 % Tag 4; 20 % Tag 7), die jeweils 9 % bzw. 17 % der Zellen transfizierten, konnte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate der Zellen erzielt werden. Fugene/aFGF zeigte an Tag 4 eine stimulierende Wirkung (14 %), die jedoch an Tag 7 nicht mehr nachweisbar war und mit DMRIE-C und Effectene konnte weder am 4. noch am 7. Tag eine Erhöhung der Proliferationsrate der transfizierten Zellen festgestellt werden.

Die ermittelte Proliferationssteigerung hatte ihr Maximum an Tag 4 nach Transfektion und nahm bis zum Tag 7 um ca. 10 % ab. Am 14. Tag nach Transfektion war kein Effekt mehr sichtbar (ohne Abb.).

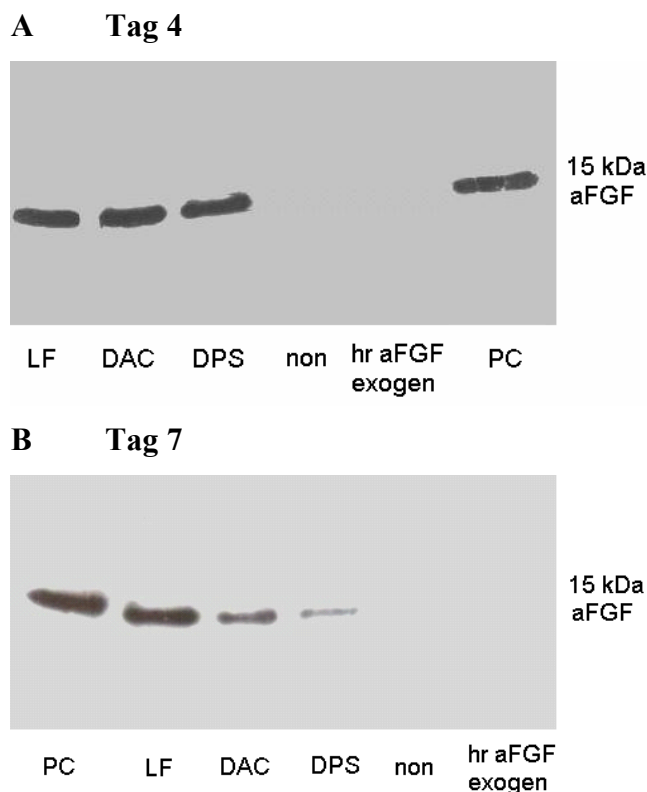
Zusätzlich wurden Raster-Elektronen-mikroskopische Aufnahmen der Zellen an den Tagen 4 und 7 nach Gentransfer von aFGF angefertigt (Abb. 11). DAC-30 (A+E), Lipofectin (B+F) und nicht-transfizierte Zellen (C+G) zeigen keine negativen Effekte auf die Zell-Morphologie, während FuGene-behandelte Zellen (D+H) am Tag 7 zytopathische Effekte entwickeln.



**Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Darstellung der Zellmorphologie nach aFGF-Gentransfer.** Tag 4: A-D; Tag 7: E-H. DAC (A+E), LF (B+F) und nicht-transfizierte Zellen (C+G) zeigen keine Beeinträchtigung der Zellmorphologie, während FU (D+H) am Tag 7 (H) zytopathische Effekte verursacht.

### 3.1.3 Expression von aFGF nach Gentransfer in HCEC

Da aFGF keine klassische Signalsequenz zur Sekretion aus der Zelle besitzt, wurde zur Überprüfung der aFGF-Expression nach Gentransfer durch die verschiedenen Lipide ein Western Blot der Zelllysate durchgeführt. Dazu wurden Tag 4- und Tag 7-Lysate der transfizierten Zellen hergestellt und mit gleicher Gesamtproteinkonzentration (100 µg) aufgetragen und getestet. Das aFGF-Protein konnte in allen transfizierten Zellen nachgewiesen werden, unabhängig vom verwendeten Lipid (Abb. 12). Es konnte jedoch weder in Zellen, denen aFGF exogen zugeführt worden war noch in nicht-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die an Tag 7 festgestellte abnehmende Wirkung von aFGF auf die Zellproliferation konnte hier mit einer verringerten Expression des Wachstumsfaktors an Tag 7 im Vergleich zu Tag 4 bestätigt werden. Zusätzlich konnten die mit DAC, DPS und LF transfizierten Zellen als stärkste aFGF-Produzenten identifiziert werden, was ebenfalls durch die Proliferationsergebnisse Bestätigung findet.



**Abbildung 12: Western Blot zur Bestimmung der Expression von aFGF.** Die Expression von aFGF ist in transfizierten HCEC an Tag 4 (A) und 7 (B) mit Lipofectin (LF), DAC-30 (DAC), DAC-30 + PS (DPS) und Kontrollen dargestellt. Als Positivkontrolle dienten 50ng humanes rekombinantes aFGF (PC). Expression wurde in allen transfizierten Zellen festgestellt, mit abnehmender Quantität von Tag 4 zu Tag 7. Keine Expression zeigte sich in nicht-transfizierten Zellen (non) und Zellen, die mit 10ng/ml exogenem humanen rekombinanten aFGF (hr aFGF exogen) behandelt worden waren.

### 3.2 Einsatz von Gentransfermethoden in der Keratoplastik

#### 3.2.1 Adenoviraler Gentransfer

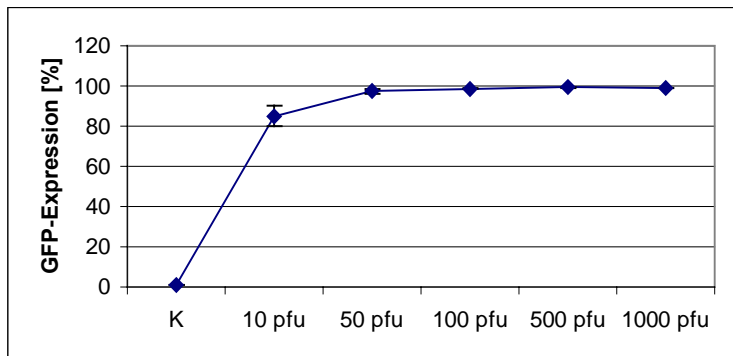
Als eine weitere Möglichkeit des Gentransfers in korneale Endothelzellen wurden adenovirale Vektoren genutzt. Adenoviren führen ebenso wie der liposomale Gentransfer zu einer transienten Genexpression, die optimal für eine Modulation des Zytokinprofils (Th1/Th2) unmittelbar nach der Transplantation geeignet ist. Zytokin-exprimierende adenovirale Vektoren wurden bereits erfolgreich in Modellen von Herz- und Nierentransplantationen eingesetzt. Der Vorteil adenoviraler Vektoren gegenüber dem liposomalen Gentransfer liegt in ihrer wesentlich höheren Gentransfereffizienz. Zudem standen die für diese Arbeit verwendeten Adenoviruskonstrukte (AdvIL-10, AdrIL-4) bereits zur Verfügung, sodass die zeitaufwändigen Klonierungsarbeiten entfallen konnten.

Zunächst wurde die Effizienz des adenoviralen Gentransfers in HCEC mit Hilfe des Reportergenkonstruktes AdEGFP und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Da sich dies als überaus erfolgreich erwies und das Hornhautendothel eine wichtige Zielstruktur bei der Abstoßung kornealer Transplantate ist, wurden im nächsten Schritt Rattenhornhäute *ex vivo* mit demselben Konstrukt (AdEGFP) transduziert und Gewebeschnitte angefertigt, um mittels Fluoreszenzmikroskopie die transduzierten Zellen bzw. Gewebe nachzuweisen.

Der Ermittlung des Transduktionserfolgs für das Hornhautendothel auch an der ganzen Kornea folgten weitere *ex vivo*-Transduktionen mit adenoviralen Konstrukten für die immunregulatorisch wirkenden Zytokine vIL-10 und der Kombination aus vIL-10 und rIL-4, mit jeweils anschließender Bestimmung der Zytokinproduktion durch die Hornhäute. Diese Versuche waren die Basis für den nachfolgenden *in vivo*-Einsatz der mit diesen Zytokinen transduzierten Korneae, zur Modulation der Immunreaktion nach Keratoplastik.

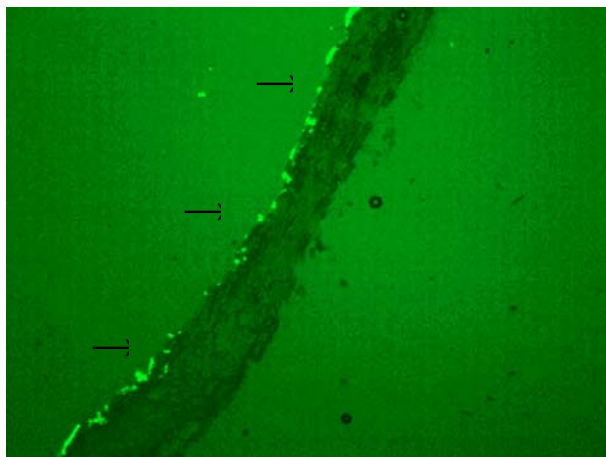
##### 3.2.1.1 Adenoviraler Marker-Gentransfer in HCEC und *ex vivo* kultivierte Rattenhornhäute

Die Expressionsqualität und -kinetik der adenoviralen Vektoren wurde zunächst mit Hilfe des Reporterkonstrukts AdEGFP sowohl in HCEC als auch in *ex vivo* kultivierten Ratten-Korneae getestet. Unter Zugabe von Polybren zur Verbesserung der Gentransfereffizienz (Doebis et al., 2002) zeigte sich bereits bei 50 pfu, dass fast 100 % der HCEC ohne Auftreten zytotoxischer Effekte transduziert werden konnten (Abb. 13), womit sich diese Zellen als optimale „Zielzellen“ für den adenoviralen Gentransfer erwiesen.



**Abbildung 13: Gentransfereffizienz von HCEC, die mit verschiedenen Konzentrationen von AdEGFP und 8µg/ml Polybren transduziert wurden.**

Um zu untersuchen, welche Zellen der gesamten Kornea nach adenoviralem Gentransfer in *ex vivo* verstärkt transduziert werden, wurde erneut das Reporterkonstrukt (AdEGFP) eingesetzt. 48 Stunden nach dem Gentransfer von  $1 \times 10^8$  pfu/Kornea wurden die Hornhäute in OCT eingefroren, Gewebeschnitte angelegt und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch adenoviralen Gentransfer vor allem das Endothel transduziert wurde, jedoch nicht das Hornhautepithel bzw. Keratozyten im Hornhautstroma (Abb. 14).

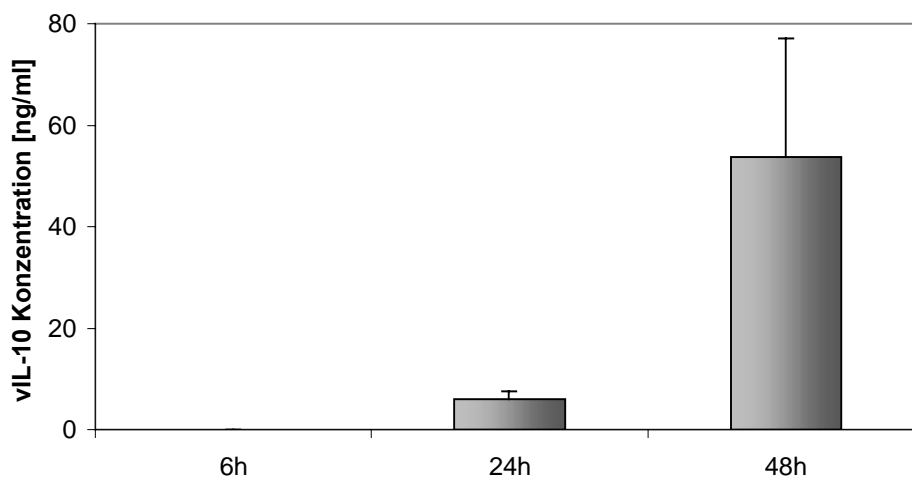


**Abbildung 14: Darstellung einer Kornea nach adenoviralem Gentransfer von EGFP.** Auf der linken Seite ist das transduzierte Hornhautendothel sehr gut zu erkennen. Keratozyten und Epithelzellen weisen keine EGFP-Expression auf. Die Kornea wurde mit  $1 \times 10^8$  pfu AdEGFP transduziert und nach 48 h in OCT eingefroren. Es wurden Gefrierschnitte angefertigt, die unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert werden konnten. Die Pfeile zeigen das grün fluoreszierende Endothel.

### 3.2.1.2 *In vitro*-Untersuchungen zur Genexpression nach adenoviralem Gentransfer

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden (Ritter et al., 1999a), dass bereits 24 Stunden nach Applikation von AdrIL-4 an *ex vivo* kultivierten Hornhäuten signifikante Konzentrationen von IL-4 im Überstand detektierbar sind. Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, dass unter den gewählten Bedingungen die Expression des therapeutischen Gens über mehr als 6 Tage erhalten bleibt (Ritter et al., 1999a).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bzgl. der Expression von vIL-10 nach adenoviralem Gentransfer in *ex vivo* kultivierten Korneae erzielt werden. Dazu wurden 6 Ratten-Hornhäute mit jeweils  $1 \times 10^8$  pfu AdvIL-10 / 500  $\mu$ l / Kornea transduziert. Nach drei Stunden wurden die adenoviralen Bestandteile durch vorsichtiges, aber gründliches Spülen der Hornhäute entfernt und diese mit 2% FKS-haltigem Medium versetzt. Die Zytokinexpression wurde mittels ELISA an verschiedenen Zeitpunkten überprüft (Abb. 15).



**Abbildung 15: Expression von vIL-10 nach *ex vivo*-Transduktion von 6 Korneae.** Die Hornhäute wurden mit jeweils  $1 \times 10^8$  pfu AdvIL-10 transduziert und zu den verschiedenen Zeitpunkten der Zytokingehalt des Kulturüberstandes bestimmt; n=6.

### 3.2.1.3 Kombiniertes adenoviraler Gentransfer (AdvIL-10/AdrIL-4)

Zur Überprüfung der Ko-Expression von vIL-10 und rIL-4 nach kombiniertem adenoviralem Gentransfer wurden drei Rattenhornhäute mit den adenoviralen Konstrukten für beide Zytokine mit jeweils  $1 \times 10^8$  pfu/ml/Kornea gleichzeitig transduziert. Eine Kornea diente als Kontrolle und wurde nicht transduziert. Nach dreistündiger Inkubation wurden alle Virusbestandteile durch vorsichtiges, aber gründliches Spülen entfernt und die Hornhäute mit



2% FKS-haltigem Medium versetzt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und der entnommene Überstand zur Analyse des Zytokingehalts eingefroren (Tab. 6).

Tabelle 6: Analyse des Zytokingehalts in Überständen von mit rIL-4 und vIL-10 transduzierten Korneae.

	rIL-4 ng/ml	vIL-10 ng/ml
Kornea 1	> 100	> 200
Kornea 2	> 100	> 200
Kornea 3	> 55	> 175
Kornea 4 (Kontrolle)	n.d.	n.d.

n.d.=nicht detektierbar

#### **3.2.1.4 Adenoviraler Gentransfer zur Modulation der Abstoßungsreaktion transplanterter Ratten-Hornhäute**

Nachdem die oben beschriebenen *ex vivo*-Untersuchungen gezeigt hatten, dass der adenovirale Gentransfer immunregulatorisch wirkender Proteine an organkultivierten Korneae sehr effizient ist, sollte weiterhin untersucht werden, ob sich damit die Abstoßungsreaktion nach allogener Keratoplastik beeinflussen lässt. Erfahrungen aus tierexperimentellen Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass die Induktion der allogenen Transplantatabstoßung vor allem in der Milz, aber auch regional, d.h. im Transplantat, angrenzender Empfängerhornhaut und regionalem lymphoiden Gewebe erfolgt. Durch die Möglichkeit, Hornhauttransplantate längere Zeit zu konservieren, liegen ideale Voraussetzungen des *ex vivo*-Gentransfers zur Immunmodulation vor.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde dies mit Transplantaten versucht, die *ex vivo* mit dem adenoviralen Konstrukt für IL-4 transduziert worden waren. Hierbei zeigte sich, dass der IL-4 Gentransfer zu keiner signifikant nachweisbaren Immunmodulation der Transplantatrejektion führte (Pleyer et al., 2000). Da in einem allogenen Ratten-Modell der Nierentransplantation nach Ko-Transduktion von IL-4 mit vIL-10 (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kupiec-Weglinski, Los Angeles, USA) ein signifikanter Effekt auf das Transplantatüberleben erzielt werden konnte, nachdem sich auch dort der alleinige IL-4-Gentransfer als nicht erfolgreich herausgestellt hatte, sollten diese Ergebnisse auch im Modell der Keratoplastik überprüft werden (Kato et al., 1999).

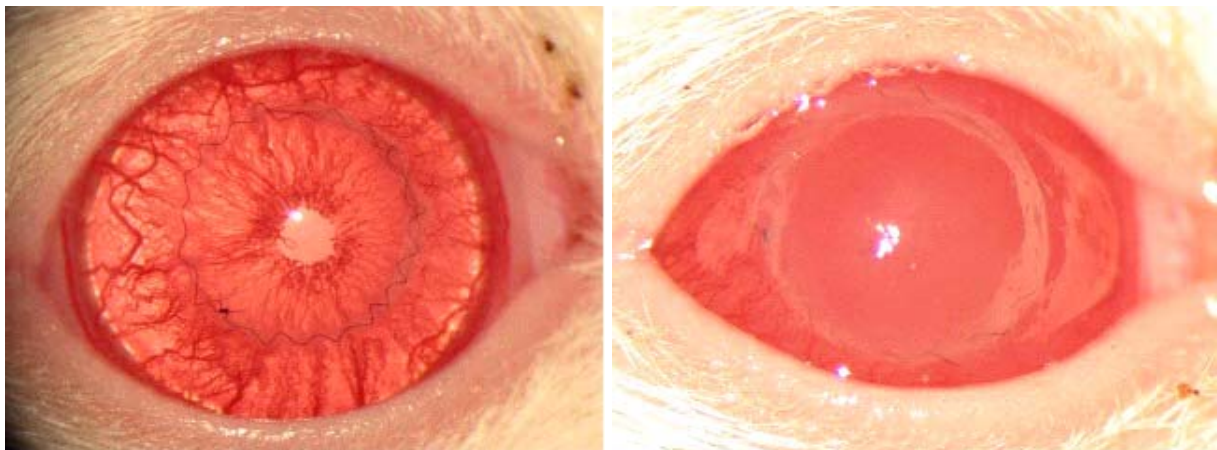
Um die Frage zu klären, ob der *ex vivo*-Gentransfer zu einer lokalen und/oder systemischen Beeinflussung der Immunreaktion nach Transplantation führt, sollten an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 10 und Tag der Abstoßung) lymphatische Organe (drainierende und nicht-drainierende Lymphknoten, Milz) entnommen und gemischte Lymphozytenkulturen angesetzt

werden. Zusätzlich wurde das Transplantat explantiert und mit Hilfe der Immun-Histochemie auf infiltrierende Effektorzellen untersucht.

### 3.2.1.5 Adenoviraler Gentransfer von vIL-10 in der Keratoplastik

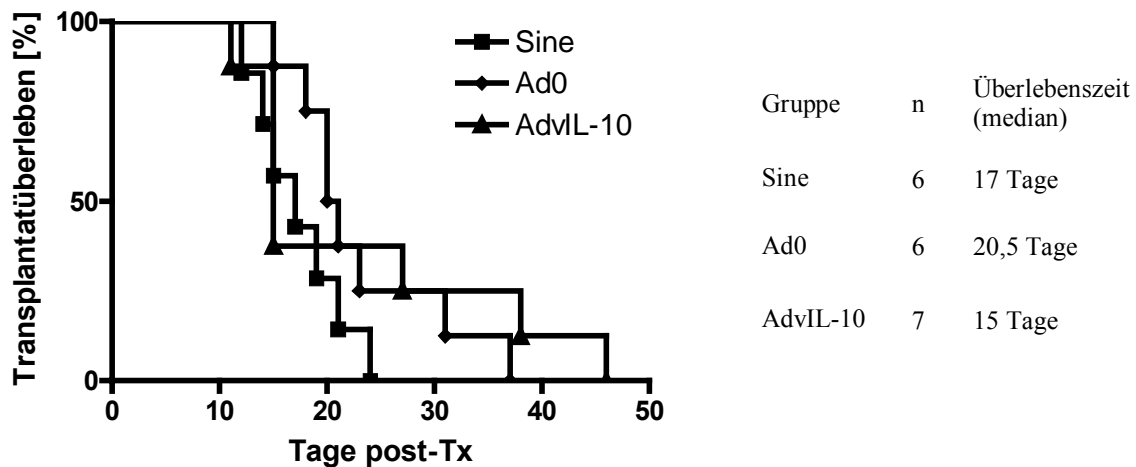
#### 3.2.1.5.1 Einfluss der vIL-10-Produktion durch transduzierte Hornhäute auf die Transplantatüberlebenszeit

Für die Transplantationen wurden die Spender-Hornhäute mit jeweils  $1 \times 10^8$  pfu der adenoviralen Vektoren (Ad0 als Kontrollvektor ohne therapeutisches Gen, AdvIL-10) *ex vivo* transduziert. Als zweite Kontrollgruppe dienten nicht-transduzierte Hornhäute. Die transplantierten Tiere wurden 2, 4 und 7 Tage nach OP und anschließend über 4 Wochen täglich kontrolliert. Die Hornhauttrübung wurde in einer Skala von 0-4 beurteilt, wobei eine Bewertung ab 3 als abgestoßen galt (Abb. 16).



**Abbildung 16: Darstellung von Hornhauttransplantaten im Tier.** Links: ein klares Transplantat, Bewertung 0; rechts ein abgestoßenes, trübes Transplantat, Bewertung 4.

Das verwendete Transplantationsmodell WF auf Lew ist ein starkes Abstoßungsmodell und weist einen kompletten „Mismatch“ innerhalb der MHC-I- und MHC-II-Gene auf. Die durchschnittliche Überlebenszeit (Median) der Transplantate ohne Behandlung (n=6) lag bei 17 Tagen, die der mit Ad0 transduzierten Korneae (n=6) bei 20,5 Tagen. Der *ex vivo* vIL-10-Gentransfer in die Spenderkorneae führte zu keiner signifikant verlängerten Transplantatüberlebenszeit. Hier lag die mittlere Transplantatüberlebenszeit (Median) bei 15 Tagen (n=7) (Abb. 17).

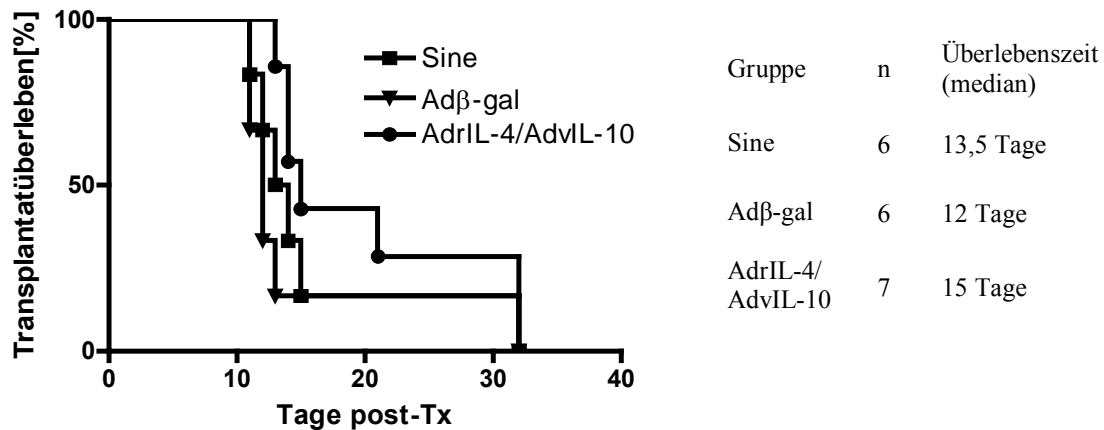


**Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten nach Transduktion mit AdvIL-10, Kontrollvektor (Ad0) und unbehandelten Hornhäuten.** Der Einsatz des therapeutischen Gens führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit, jedoch wird ein verlängernder Effekt durch die Behandlung mit dem Kontrollvektor (Ad0) sichtbar; Sine=unbehandelt, post-Tx=nach Transplantation;  $p>0,05$ .

### 3.2.1.6 Kombiniertes adenoviraler Gentransfer von vIL-10 und rIL-4 in der Keratoplastik

Die Spender-Hornhäute (WF) wurden *ex vivo* mit jeweils  $1 \times 10^8$  pfu/ml adenoviralen Vektoren transduziert, die für die Zytokine vIL-10 (AdvIL-10) und rIL-4 (AdrIL-4), sowie als Kontrollvektor für  $\beta$ -Galaktosidase (Ad $\beta$ -gal) kodieren und in die Empfängertiere (Lew) transplantiert. Die Verwendung des Ad $\beta$ -gal-Kontrollvektors in diesem Versuchsansatz beruhte auf der Feststellung, dass der Einsatz des Kontrollvektors Ad0 zu einer längeren Transplantat-Überlebenszeit führte als der des therapeutischen adenoviralen Vektors AdvIL-10. Der Versuch wurde 32 Tage post OP beendet, da davon ausgegangen wurde, dass zu diesem Zeitpunkt ein Langzeitüberleben vorliegt. Auch die Tiere, die ihr Transplantat noch nicht abgestoßen hatten, wurden am Tag 32 getötet. Dabei besaß jeweils ein Tier in den Kontrollgruppen (ohne Behandlung, Ad $\beta$ -gal) ein klares Transplantat, in der AdvIL-10/AdrIL-4-Gruppe zeigten zwei Tiere keinerlei Hornhauttrübungen. Aus der unterschiedlichen Versuchsdauer im AdvIL-10- und im AdvIL-10/AdrIL-4-Versuch ergaben sich unterschiedliche Überlebensmediane für die unbehandelte Kontrollgruppe. Diese Unterschiede sind jedoch nicht auf Operationsfehler zurückzuführen und trotz zahlenmäßiger Differenz nicht signifikant. Die mittlere Überlebenszeit (Median) der Transplantate betrug in der allogenen nicht-transduzierten Kontrollgruppe (n=6) 13,5 Tage. Die mit dem

Kontrollvektor Ad $\beta$ -gal transduzierten Korneae (n=6) wurden nach durchschnittlich (Median) 12 Tagen abgestoßen. Die ko-transduzierten Hornhäute (n=7) überlebten mit 15 Tagen zwar länger als die Kontrollen, dies reichte aber nicht zu einem statistisch signifikanten Effekt aus (Abb. 18).



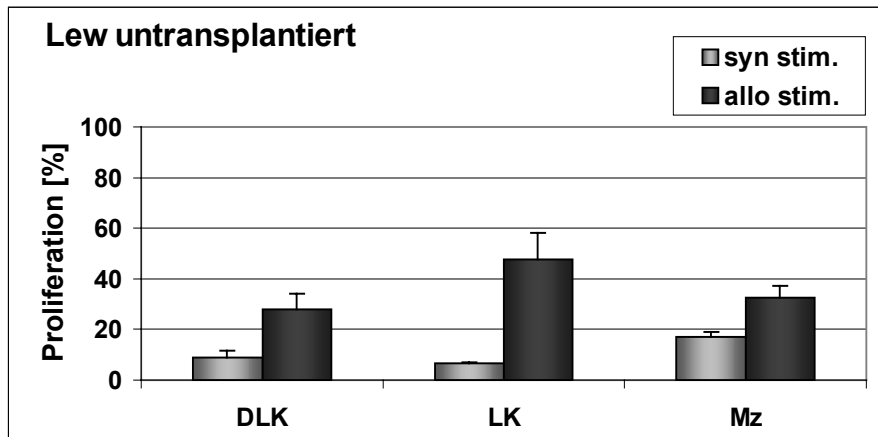
**Abbildung 18:** Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten nach Ko-Transduktion mit AdvIL-10 und AdrIL-4. Der Einsatz des therapeutischen Gens führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit; Sine=unbehandelt, post-Tx=nach Transplantation;  $p>0,05$ .

### 3.2.1.7 Einfluss des adenoviral exprimierten Zytokins vIL-10 durch *ex vivo* transduzierte Hornhäute auf die Immunreaktion nach Keratoplastik

Um zu untersuchen, ob der Gentransfer die Immunreaktion lokal und/oder systemisch beeinflussen kann, wurden am Tag 10 nach Transplantation, sowie am Tag der Abstoßung in zwei verschiedenen Versuchsgruppen die drainierenden Lymphknoten (lokale Effekte) sowohl auf der transplantierten Seite als auch auf der nicht-transplantierten Seite, sowie die Milz (systemische Effekte) entnommen. Die isolierten Lymphozyten wurden mit dem Membranfarbstoff CFDA-SE gefärbt, um ihre Proliferationsaktivität nach Stimulation mit dem Donor-Antigen im FACS sichtbar machen zu können. Bei der Zellteilung wird dieser Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, sodass die Abnahme der Fluoreszenzintensität ein Maß für die Proliferationsstärke der Lymphozyten darstellt. Nach 4 Tagen erfolgte die Auswertung am Durchflusszytometer anhand der mit CFDA-SE markierten Lymphozyten.

Als Kontrolle dienten die Lymphozyten eines nicht-transplantierten Tieres (Lew), die sowohl syngen (Lew) als auch allogenen (WF) stimuliert wurden (Abb. 19). Syngen stimulierte

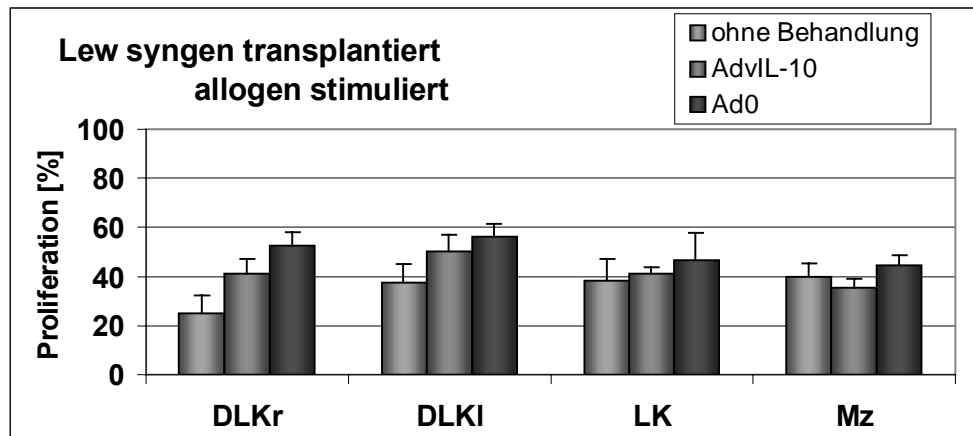
Lymphozyten zeigten kaum Proliferation, während, wie zu erwarten war, allogen stimulierte Lymphozyten eine erhöhte Zellteilungsaktivität aufwiesen.



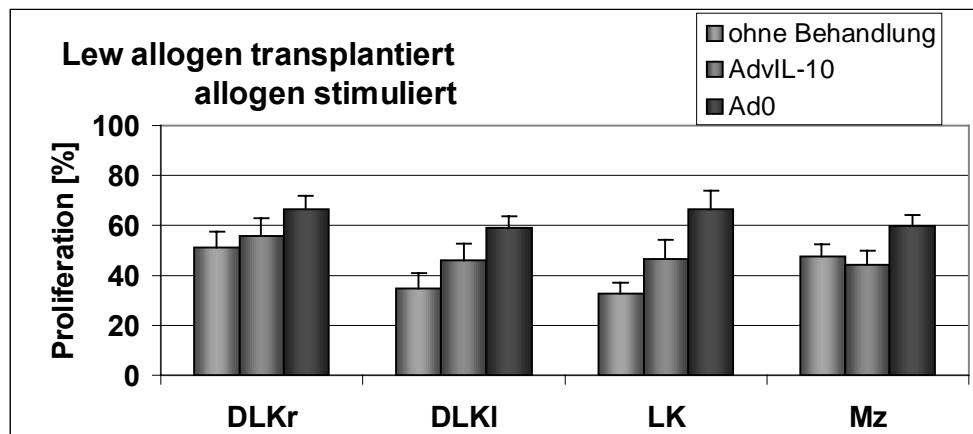
**Abbildung 19: Darstellung der Proliferation von T-Zellen einer nicht-transplantierten Lewis-Ratte.** Aus (drainierenden) zervikalen Lymphknoten (DLK), Lymphknoten aus der Leistengegend (LK) und Milz (Mz) wurden Lymphozyten isoliert und nach Färbung mit CFDA-SE syngen mit bestrahlten Lewis-Milzzellen und allogen mit bestrahlten WF-Milzzellen stimuliert. Nach 4 Tagen Inkubation erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (n=4 Tiere). syn=syngen; allo=allogen; stim.=stimuliert.

Als zusätzliche Kontrollen dienten syngen transplantierte Tiere (Lew auf Lew) aller Behandlungsgruppen (ohne Behandlung, Ad0, AdvIL-10), von denen am Tag der Abstoßung des am gleichen Tag allogen transplantierten Partnertieres, die Lymphozyten isoliert und in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR) allogen stimuliert wurden (Abb. 20a). In der unbehandelten Gruppe ist die Reaktion der Zellen aus den drainierenden Lymphknoten weniger stark als die Reaktion der adenoviral behandelten Tiere. In den vom Transplantat weiter entfernten Organen (Lymphknoten der Leistengegend und Milz) verhalten sich die Lymphozyten aller drei Gruppen ähnlich. Die Proliferation der gleichen Zellen nach syngener Stimulation in einem zweiten Versuchsansatz lag deutlich unter der dargestellten allogen stimulierten Proliferation (nicht gezeigt).

A



B

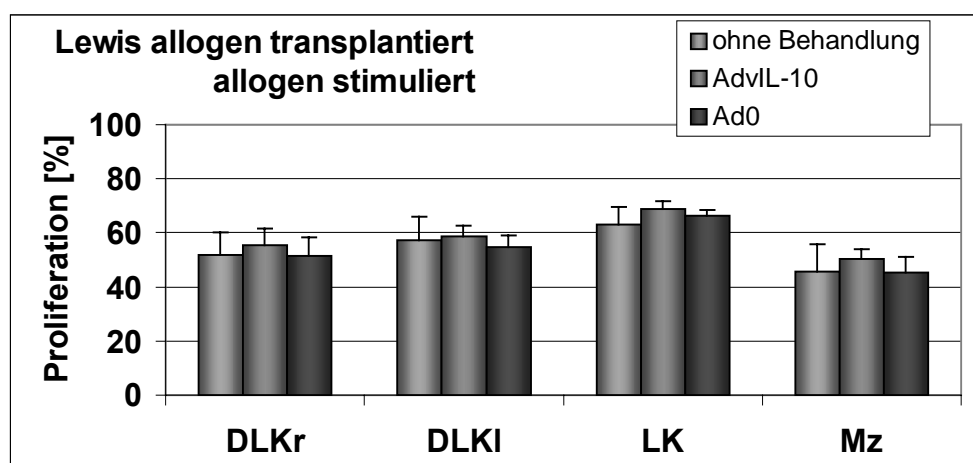


**Abbildung 20: Vergleich der Immunreaktionen von syngen und allogen transplantierten Tieren am Tag der Abstoßung, nach allogener Stimulation der isolierten Lymphozyten.** Aus den drainierenden Lymphknoten der transplantierten rechten (DLKr, n=7-8) und der nicht-transplantierten linken Seite (DLKI, n=7-8), den Lymphknoten der Leistengegend (LK, n=2-6) und der Milz (Mz, n=7-8) wurden am Tag der Abstoßung die Lymphozyten isoliert und allogen mit bestrahlten WF-Milzzellen stimuliert. Nach 4 Tagen in Kultur wurde die Intensität von CFDA-SE in den Immunzellen gemessen und daraus ihre Proliferationsaktivität berechnet.

Die eigentlichen Behandlungsgruppen wurden allogen nach *ex vivo*-Gentransfer mit Ad0 oder AdvIL-10 bzw. untransduziert transplantiert (Abb. 20b). Hier ist im Vergleich zu den syngen transplantierten Tieren eine Steigerung der Proliferationsaktivität der Lymphozyten aller Behandlungsgruppen in den drainierenden Lymphknoten auf der transplantierten Seite und der Milz ersichtlich. Die Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten der nicht-transplantierten Seite verhalten sich wie im syngen transplantierten Tier, während die der nicht-drainierenden Lymphknoten in der Ad0-Gruppe eine gesteigerte Proliferation zeigen.

Eine Hemmung der Lymphozyten-Proliferation durch das adenoviral exprimierte vIL-10 konnte somit nicht erreicht werden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Tiere 10 Tage nach Transplantation getötet, um zu einem früheren Zeitpunkt zu untersuchen, ob eine lokale oder systemische Beeinflussung der Lymphozyten-Proliferation nachweisbar ist. Zu diesem Zeitpunkt zeigte kein Transplantat Hinweise auf eine Abstoßungsreaktion. Nach Lymphozyten-Isolation wurde erneut eine MLR angesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass auch 10 Tage nach Transplantation kein immunsuppressiver Effekt von vIL-10 im Vergleich zu den Kontrollgruppen erreicht werden konnte (Abb. 21).



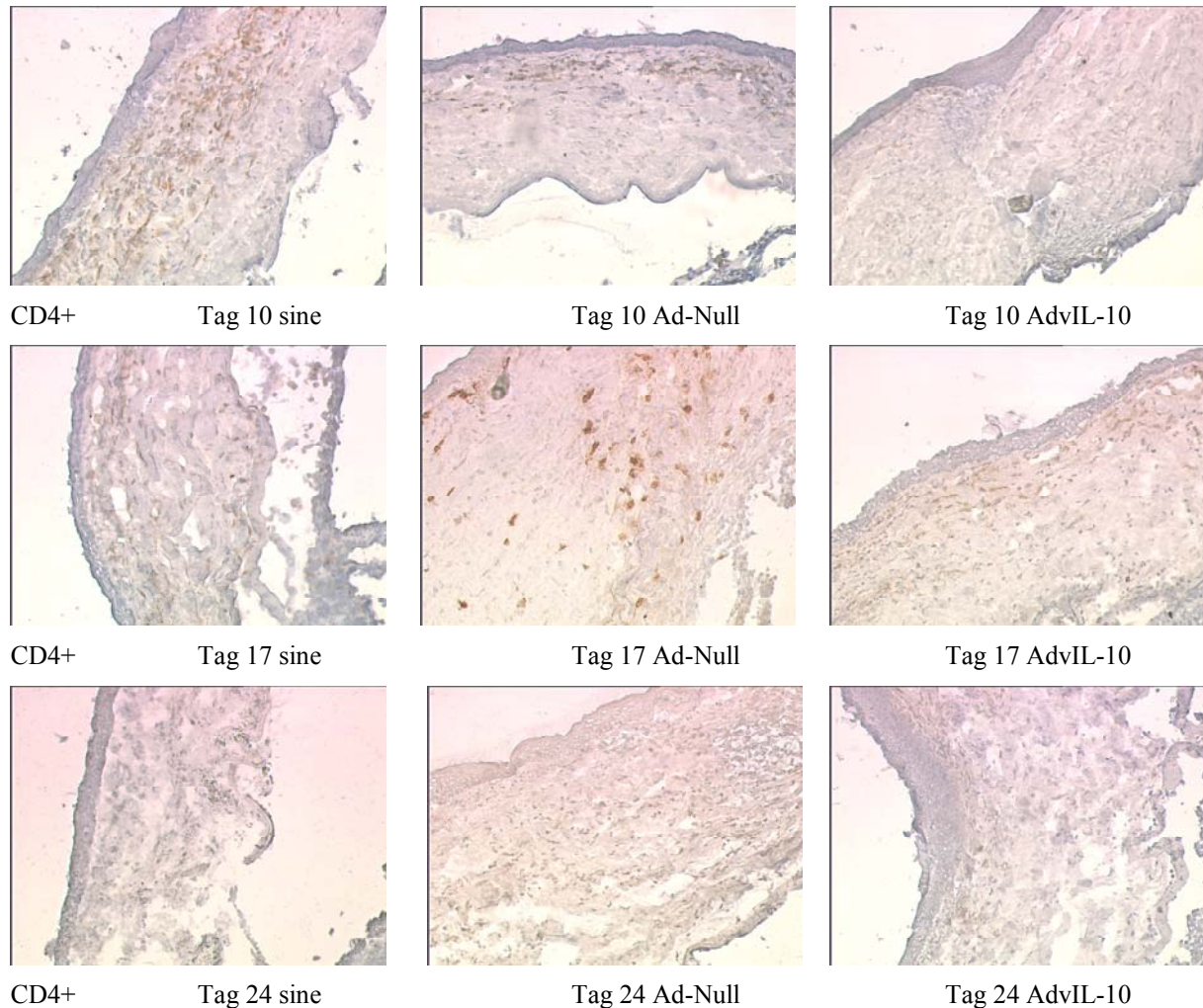
**Abbildung 21: Proliferationsanalyse der T-Lymphozyten der drei Behandlungsgruppen 10 Tage nach Transplantation.** Aus den drainierenden Lymphknoten der transplantierten rechten (DLKr, n=4-5) und der nicht-transplantierten linken Seite (DLKI, n=4-5), den Lymphknoten der Leistengegend (LK, n=4-5) und der Milz (Mz, n=3-5) wurden 10 Tage nach Transplantation die Lymphozyten isoliert und allogen mit bestrahlten WF-Milzzellen stimuliert. Nach 4 Tagen in Kultur wurde die Intensität von CFDA-SE in den Immunzellen gemessen und daraus ihre Proliferationsaktivität berechnet.

DLKr	Drainierende Lymphknoten rechts (transplantierte Seite)
DLKI	Drainierende Lymphknoten links (untransplantierte Seite)
LK	Lymphknoten aus der Leistengegend
Mz	Milz

### 3.2.1.8 Immunhistologische Untersuchungen

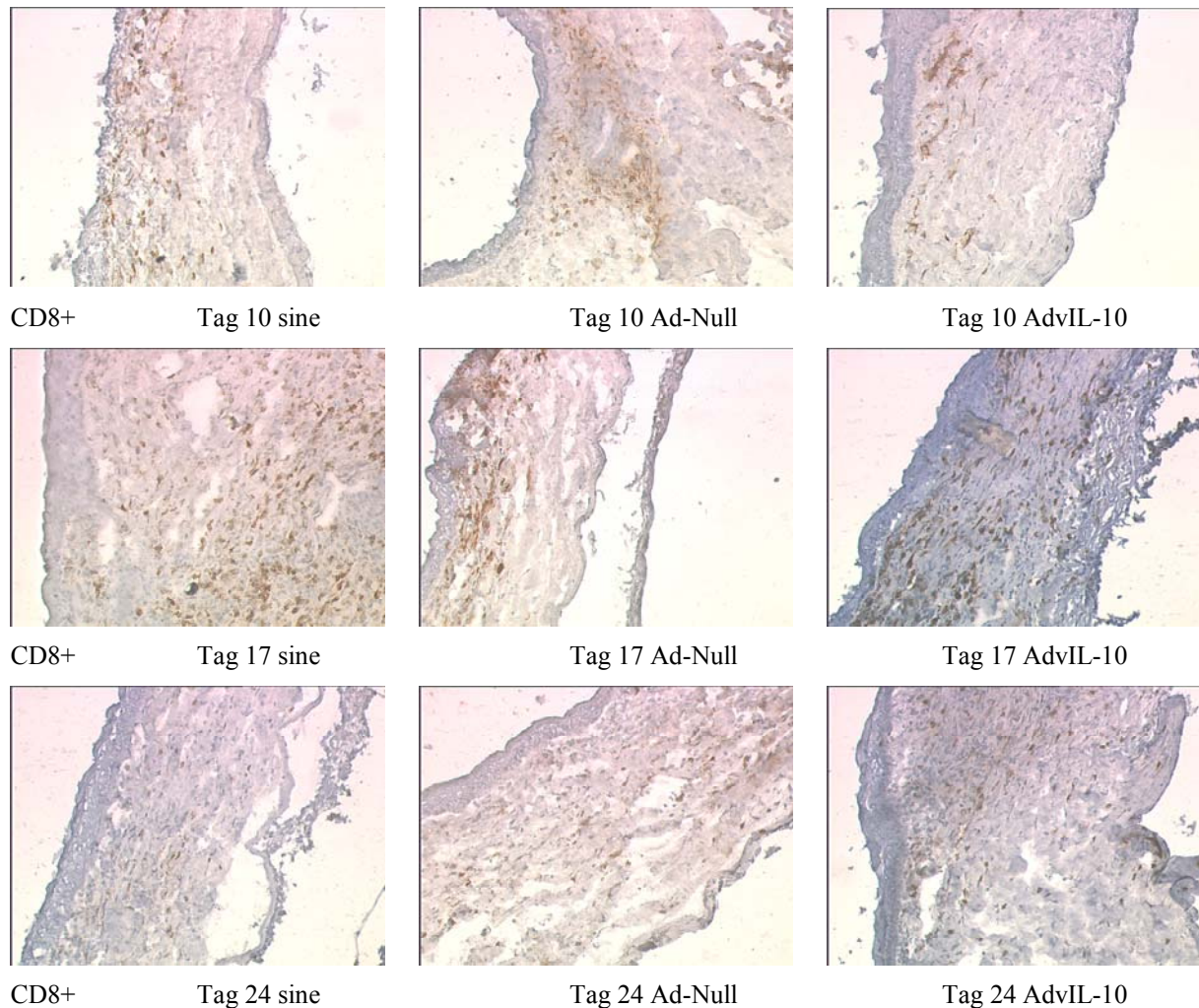
Zur Beurteilung zellulärer Infiltrate im Transplantat wurden zu jedem Versuchsansatz immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden Transplantate zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 10, 17, 24) nach dem Eingriff kryofixiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die detaillierten Ergebnisse dazu sind in der Dissertation zum Dr. med. von Frau Nadine Schmidt nachzulesen. Hier wird nur eine

kurze Gegenüberstellung von Korneaschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Beispiel von infiltrierenden CD4+ (Abb. 22) und CD8+ T-Zellen (Abb. 23) abgebildet. Die Anzahl dieser Zellen war am Tag 10 nach Transplantation in der AdvIL-10 Gruppe verringert; dieser Effekt war jedoch für CD8+ T-Zellen am Tag 17 und für CD4+ T-Zellen am Tag 24 nicht mehr nachweisbar.



**Abbildung 22: Darstellung von CD4+-Zellen in Transplantaten der verschiedenen Behandlungsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.** Die Anzahl der infiltrierenden CD4+-Zellen ist in der Therapiegruppe (AdvIL-10) am Tag 10 nach Transplantation verringert, der Unterschied zwischen den Gruppen ist jedoch am Tag 24 nach Transplantation nicht mehr sichtbar. (Die CD4-positiven Zellen erscheinen braungefärbt.)





**Abbildung 23: Darstellung von CD8+-Zellen in Transplantaten der verschiedenen Behandlungsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.** Die Anzahl der infiltrierenden CD8+-Zellen ist in der Therapiegruppe (AdvIL-10) am Tag 10 nach Transplantation verringert, der Unterschied zwischen den Gruppen ist jedoch bereits am Tag 17 nach Transplantation nicht mehr sichtbar. (Die CD8-positiven Zellen erscheinen braungefärbt.)

### 3.2.2 Liposomaler Gentransfer von vIL-10 in der Keratoplastik

Die adenoviral übertragenen Zytokingene führten zu keiner nennenswerten Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Auch in der MLR und der Histologie konnten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Immunantwort durch den lokalen Gentransfer gefunden werden. Aus diesem Grund sollte in einem abschließenden Versuch geklärt werden, ob der lokale *ex vivo* vIL-10-Gentransfer mit Hilfe von Liposomen die Transplantatüberlebenszeit von transplantierten Korneae verlängern kann. Da die Liposomenformulation Lipofectamine 2000 in der Zellkultur weit höhere Effizienzen erreichte (ca. 50%, Prof. A.J. George, London, persönliche Mitteilung), als die in dieser Arbeit untersuchten Lipide, und sich dieser Effekt durch den Einsatz von Transferrin noch verstärken ließ, wurde Lipofectamine 2000 als Liposom für den *ex vivo*-Zytokingentransfer vor Keratoplastik eingesetzt.

### 3.2.2.1 *In vitro*-Untersuchungen zur Genexpression nach liposomalem Gentransfer

Zur Überprüfung der vIL-10-Expression in den transfizierten Hornhäuten wurden an den Tagen 1, 2, 4, 6 und 8 nach *ex vivo*-Transfektion, die Überstände entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Der Zytokingehalt der Überstände wurde per ELISA ermittelt und ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass für Tag 1 und 2 die 24h-Expression abgebildet ist, für die übrigen Tage jeweils die Expression von 48h. Trotzdem wird deutlich, dass zum Tag 8 hin der vIL-10-Gehalt bei Einsatz von 2,5 bzw. 5µg Lipofectamine 2000 ansteigt und dabei 5µg die höchste Expression unter sonst konstanten Bedingungen (1µg pcDSRα-BCRF1 + 10µg Transferrin) erreichen.

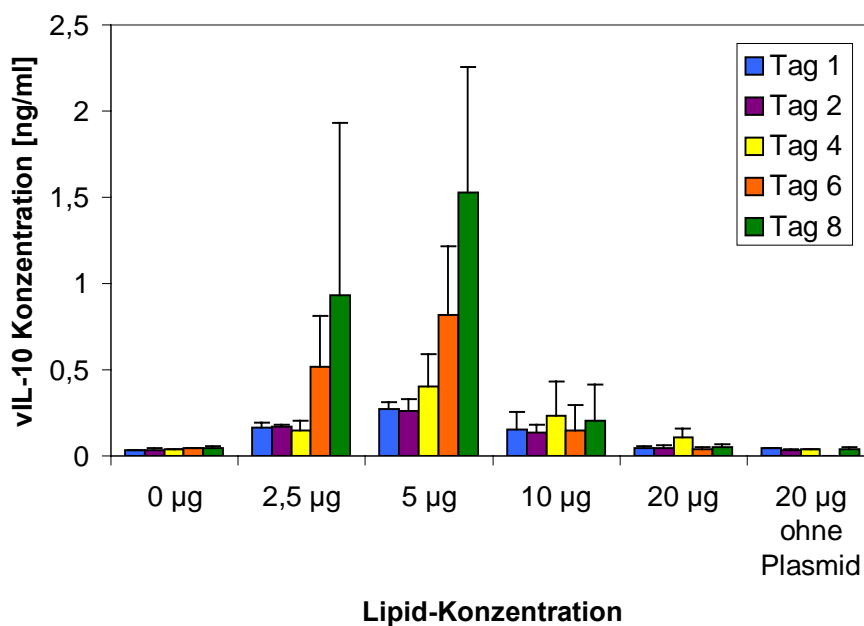
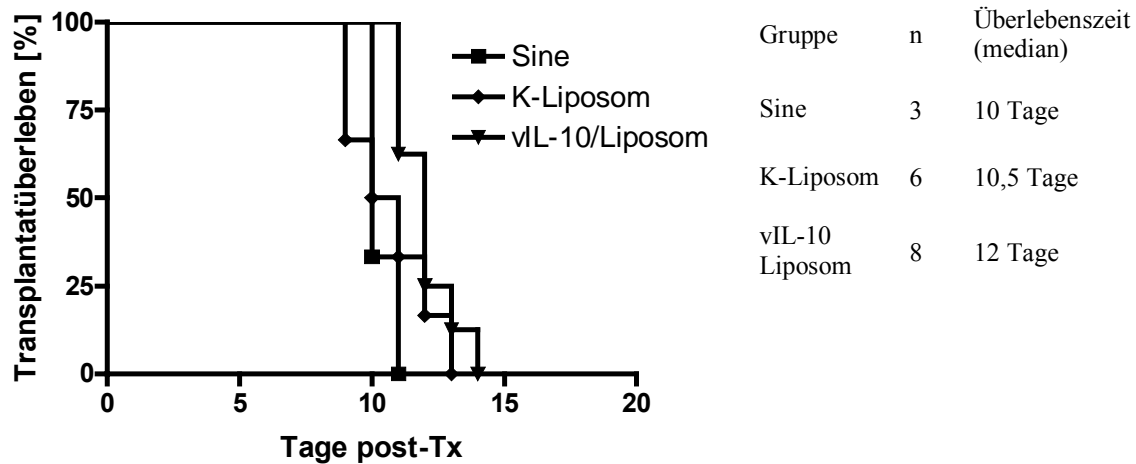


Abbildung 24: vIL-10-Konzentrationen im Überstand liposomal transfizierter Hornhäute. Die Korneae wurden frisch entnommen und sofort mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipofectamine 2000, 10µg Transferrin und 1µg pcDSRα-BCRF1 transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Überstand komplett entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Der vIL-10-Gehalt der Überstände wurde mittels ELISA bestimmt und als Mittelwert±Standardabweichung dargestellt, n=3.

### 3.2.2.2 Einfluss der vIL-10-Produktion durch liposomal transfizierte Hornhäute auf die Transplantatüberlebenszeit

Die höchste vIL-10-Produktion liposomal transfizierter Korneae wurde unter *in vitro*-Bedingungen durch den Einsatz von 5µg Lipofectamine 2000 erzielt. Aus diesem Grund fanden diese Versuchsbedingungen auch für die Transfektion der Hornhäute vor Transplantation Anwendung.

Die Ergebnisse weisen zwar auf eine tendenzielle Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit hin, jedoch konnte auch unter Verwendung von Liposomen für den lokalen Gentransfer in der Keratoplastik keine Signifikanz der Ergebnisse erreicht werden (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Transplantatüberlebenszeiten nach liposomaler vIL-10-Transfektion, Kontroll-Transfektion mit Liposom und Transferrin ohne Plasmid (K-Liposom) und unbehandelten Hornhäuten. Der Einsatz des therapeutischen Gens führte auch hier zu keiner signifikanten Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit; Sine=unbehandelt, K-Liposom=Liposom-Kontrolle, post-Tx=nach Transplantation;  $p>0,05$ .

## 4 Diskussion

Die Hornhauttransplantation ist heute mit Abstand die häufigste Allotransplantation humanen Gewebes. Durch ausgereifte mikrochirurgische Techniken, ein besseres Verständnis der Hornhautphysiologie und die Anwendung anti-inflammatorischer Medikamente wird der Keratoplastik eine Sonderrolle mit guten postoperativen Ergebnissen eingeräumt. Zu den Problemen die im Zuge der Hornhauttransplantation auftreten können, gehören der nach wie vor akute Spendermangel und eine Transplantatschädigung, die sowohl vor, als auch nach Transplantation auftreten kann. Dabei wird der Mangel an Spender-Hornhäuten vor allem durch einen möglichen Zellverlust am Hornhautendothel während der Langzeitlagerung vor Keratoplastik verstärkt, der die Transplantatqualität stark vermindert und einen Einsatz der entsprechenden Hornhäute für die Transplantation unmöglich macht. Ein anderer wichtiger Aspekt der Transplantatschädigung betrifft immunvermittelte Allograftreaktionen nach Transplantation, die bei bis zur Hälfte der Transplantierten auftreten können und zu einem Verlust des Transplantats führen.

Lösungsansätze zu beiden Kernproblemen der Keratoplastik, mit Bezug auf das Hornhautendothel, wurden in der vorliegenden Arbeit unter Zuhilfenahme von gentherapeutischen Maßnahmen untersucht. Im ersten Schritt gelang es, die Gentransferbedingungen für verschiedene nicht-virale Transfektionsreagenzien für den Einsatz in HCEC zu optimieren (Abb. 9, Tab. 5). Als nächstes wurde der optimierte nicht-virale Gentransfer des Wachstumsfaktors aFGF dazu eingesetzt, die Proliferation von Hornhautendothelzellen *in vitro* zu stimulieren, wobei sich DAC-30 und Lipofectin als vielversprechendste Transfektionsreagenzien erwiesen, unabhängig von der erreichten Gentransfereffizienz (Abb. 10). In den transfizierten Zellen konnte aFGF in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden, jedoch nicht in untransfizierten Zellen und in Zellen, die mit exogenem aFGF behandelt worden waren (Abb. 12). Perspektivisch eröffnet sich damit die Möglichkeit dem Endothelzellverlust vor Transplantation entgegenzuwirken.

Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob mit Hilfe des adenoviralen bzw. liposomalen Gentransfers zweier Zytokine (vIL-10, rIL-4) in das Spendergewebe, dieses immunologisch als neue Möglichkeit der Prävention alloreaktiver Immunstimulation nach Keratoplastik modifiziert werden kann. Im Anschluss an die Untersuchung zur Gentransfereffizienz mittels Adenoviren, bei der sich eine sehr gute Transduzierbarkeit von sowohl HCEC *in vitro* (Abb. 13) als auch Hornhautendothel *ex vivo* (Abb. 14) zeigte, konnte *ex vivo* auch eine hohe und langanhaltende Zytokinexpression detektiert werden (Abb. 15, Tab. 6). Eine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit gelang jedoch weder durch den Einsatz des

adenoviral exprimierten vIL-10 (Abb. 17) noch durch die Kombinationstherapie von vIL-10 mit rIL-4 (Abb. 18). In der gemischten Lymphozytenkultur (Abb. 20, 21) und der Immunhistologie (Abb. 22, 23) konnten nur schwache Hinweise auf eine geringfügige Beeinflussung der Immunreaktionen durch den adenoviralen Gentransfer der immunmodulatorischen Zytokine festgestellt werden. Auch die liposomal mit vIL-10 transfizierten Korneae zeigten *in vitro* eine detektierbare Expression dieses Zytokins (Abb. 24), wobei die Lipidkonzentration, bei der die größte Menge an vIL-10 im Überstand nachweisbar war, auch für die Transfektion vor Keratoplastik eingesetzt wurde. Eine Tendenz zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit war durch den liposomalen vIL-10-Gentransfer in *ex vivo*-kultivierte Korneae vor Keratoplastik sichtbar, jedoch ohne dabei statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 25).

#### **4.1 Das Hornhautendothel als Zielstruktur für die Gentherapie**

Das Auge stellt ein interessantes Organ für die Gentherapie dar, da es verschiedene Vorteile gegenüber anderen Organsystemen aufweist. Die exponierte Lage des Auges, sowie seine Transparenz ermöglichen einen guten Zugang zu diesem Organ und visuelle Untersuchungsmöglichkeiten unter verschiedenen Bedingungen. Dies gilt insbesondere für die Kornea, deren Endothelzellschicht den verschiedensten Gentransfertechniken zugänglich ist, die eine relativ einfache Morphologie aufweist und über längere Zeiträume *ex vivo* kultiviert werden kann. Das Hornhautendothel ist insofern eine bedeutende Zielstruktur für gentherapeutische Ansätze, als es eine für die Funktion der gesamten Kornea entscheidende Zellschicht darstellt, deren Regenerationsfähigkeit stark eingeschränkt ist. Die Problematik der Hornhauttransplantation verdeutlicht dies auf doppelte Weise (siehe oben). Aus diesen Gründen stellt der Gentransfer in das korneale Endothel, mit dem Ziel der Modulation seiner Physiologie, einen interessanten Ansatz dar, diese bedeutsame Zellschicht zu schützen und zu erhalten.

In den vergangenen Jahren wurden etliche Studien durchgeführt, in denen verschiedene virale und nicht-virale Gentransfermethoden am Hornhautendothel getestet wurden.

##### **4.1.1 Nicht-viraler Gentransfer in das Hornhautendothel**

Zu den nicht-viralen Gentransfer-Methoden, die am Hornhautendothel erprobt worden sind, gehören die Elektroporation (Oshima et al., 2002, Blair-Parks et al., 2002), Liposomen und eine alternative Variante, genannt „Lipoadenofektion“. Dabei kommt eine Kombination aus Liposomen und Adenoviren zur Anwendung, wodurch die Effizienz der Liposomen erhöht und die Immunogenität des Vektors, gegenüber einer viralen Applikation, verringert wird.

Den Autoren gelang es, ein Gen effizient in die Hornhaut von Kaninchen zu übertragen (Arancibia-Cárcamo et al., 1998). Die Effizienz der Genübertragung war dabei etwa 14 mal höher, als bei der Anwendung von Liposomen allein. Der Nutzen der Lipoadenofektion liegt darin, dass sie Vorteile des liposomalen und adenoviralen Gentransfers verbindet und so z.B. die Immunogenität der viralen Vektoren reduzieren kann. Dies reicht jedoch nicht aus, alle Entzündungsreaktionen zu verhindern, da Lipoadenofektion eine Form des „Virus-verstärkten“ Gentransfers darstellt und so nicht wirklich nicht-viral ist.

Bei der Verwendung von Liposomen treten nur geringfügige unspezifische Immunreaktionen auf (Komplementaktivierung), desweiteren sind sie kommerziell erhältlich und problemlos zu handhaben (George et al, 2000, Pleyer und Dannowski, 2002). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Liposomen vielversprechende Vektoren für den Gentransfer an kornealen Endothelzellen sind (Tan et al., 2001, Pleyer et al., 2001b, Tan et al., 2003).

#### **4.1.1.1 Einsatz verschiedener Lipide für den Gentransfer in HCEC**

In der vorliegenden Arbeit wurden acht verschiedene nicht-virale Transfektionsreagenzien (TR) eingesetzt, um eine Zelllinie, die von humanen kornealen Endothelzellen (HCEC) abgeleitet wurde, zu transfizieren. Alle eingesetzten Transfektionsreagenzien bestehen aus Lipiden, wobei ein Teil liposomaler (Lipofectin, Lipofectamine, DMRIE-C, Cellfectin, DAC-30) und der andere Teil nicht-liposomaler (Fugene, Effectene, Superfect) Herkunft ist. Für den Lipid-vermittelten Gentransfer ist sowohl die Bedeutung der Lipid:DNA Ratio, als auch der Lipid-Konzentration beschrieben (Felgner et al., 1994, Lee et al., 1996). Aus diesem Grund wurden für jedes TR verschiedene Transfektionsbedingungen ausgetestet. Dies erfolgte mit Hilfe des Markergentransfers (EGFP), anschließender Propidiumiodid-Färbung und Messung des prozentualen Anteils grün und rot fluoreszierender Zellen an der Gesamtpopulation per Durchflusszytometer (Chen et al., 1999, Nunez et al., 2001). In deren Verlauf zeigte sich, dass Lipofectamine, Cellfectin und Superfect aufgrund ihrer Zytotoxizität unter den getesteten Bedingungen nicht für die Transfektion der HCEC geeignet sind. Daher erfolgte ein Ausschluss dieser drei TR von den weiteren Untersuchungen. Für die übrigen fünf Lipide konnten die optimalen Gentransferbedingungen, hinsichtlich geringer Toxizität, verbunden mit guter Gentransfereffizienz, bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass in Abhängigkeit von der Lipid:DNA-Ratio, hohe Lipid-Konzentrationen mit großer Gentransfereffizienz, aber auch mit starker Toxizität verbunden waren. Mit abnehmenden Lipidkonzentrationen konnte eine Verminderung der Toxizitäten, aber gleichzeitig auch der Gentransfereffizienzen verzeichnet werden. Die einzige Ausnahme bildete Lipofectin, welches mit abnehmender Lipidkonzentration zwar eine verminderte Toxizität, jedoch eine

gleichzeitig erhöhte Gentransfereffizienz zeigte. So erreichte Lipofectin mit 17 % die höchste Transfektionseffizienz unter den getesteten Lipiden. DMRIE-C, Fugene und Effectene erzielten ca. 10 % Effizienz. DAC-30 war mit 7 % das schwächste Lipid, jedoch effizienter als bei der Transfektion von bovinen kornealen Endothelzellen (Pleyer et al., 2001b).

#### **4.1.1.2 Einsatz von Protaminsulfat zur Steigerung der Gentransfereffizienz**

Protaminsulfat ist ein polykationisches Peptid, dass sehr effektiv negativ geladene DNA-Moleküle verdichten und so in Verbindung mit monokationischen Liposomen die Übertragung in verschiedene Zelltypen verstärken kann. Gentransfer mittels Liposomen ist durch eine relativ problemlose Aufnahme der Transfektionskomplexe in die Zelle gekennzeichnet. Auch die Expression der DNA im Zellkern kann relativ effizient stattfinden. Der kritischste Schritt ist die effiziente Übertragung der DNA vom Zytoplasma in den Zellkern (Zabner et al., 1995, Xu und Szoka, 1996). Protaminsulfat ist ein natürlicher Bestandteil des Spermas und hat dort die Aufgabe, durch Bindung von DNA, eine kompakte Struktur zu bilden und auf diese Weise das Erbmateriale nach der Befruchtung zum Nukleus der Eizelle zu übertragen. Da genau dies eine Schwierigkeit des Liposomen-vermittelten Gentransfer darstellt, scheint der Einsatz von Protaminsulfat eine ausgezeichnete Lösungsmöglichkeit für dieses Problem zu sein. Als günstig erweist sich weiterhin die geringe Toxizität und Immunogenität dieser Verbindung. Li et al. (1998) konnten zeigen, dass Protaminsulfat signifikant die Größe der Lipoplexe verringert und dadurch zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz beitragen kann. Um die beschriebene (Sorgi et al., 1997) Gentransfer-verstärkende Wirkung der polykationischen Substanz Protaminsulfat auf den Lipid-vermittelten Gentransfer zu testen, wurde dieses Peptid dem schwächsten TR (DAC-30) im Verhältnis 1:50 zugesetzt. DAC-30 + Protaminsulfat (DPS) erzielte eine Gentransfereffizienz von 10 % und wies damit eine um 3 % bessere Effizienz auf, als DAC-30 allein.

Die gleichzeitig zu diesen Gentransfereffizienzen ermittelten Lipid-verursachten Toxizitäten betrugen für jedes einzelne Lipid ca. 3 %. Diese geringe Toxizität mit den entsprechenden Effizienzen wurde als optimal ausgewählt, da der Zweck dieses Versuches darin bestand, dem Endothelzellverlust entgegenzuwirken und nicht durch zu hohe Konzentrationen und den damit verbundenen toxischen Effekten der Lipide, zusätzlich Zellen zu verlieren.

#### **4.1.1.3 Gentransfer von aFGF und Wirkung auf die Proliferation von Hornhautendothelzellen**

aFGF wird in der Zelle als Protein gebildet, dem die Signalsequenz für die klassische Ausschleusung aus der Zelle fehlt (Abraham et al., 1986, Jaye et al., 1986). Trotzdem kann es als Antwort auf Stress von der Zelle sekretiert werden (Jackson et al., 1992). In der Literatur wird ein alternativer exozytose-ähnlicher Weg zur Ausschleusung von FGF diskutiert (Mignatti et al., 1992), da auf der Zelloberfläche, auch von HCEC, FGF-Rezeptoren existieren, die gegen eine ausschließlich intrazelluläre Wirkung sprechen. Eine Wirkung von aFGF sowohl intrazellulär als auch an der Zell-Oberfläche wurde beschrieben (Imamura et al., 1990, Zhan et al., 1992, Wiedlocha et al., 1996). Dabei unterscheidet man zwischen sogenannten Hochaffinitätsrezeptoren (FGFR1 bis FGFR5) und Niedrigaffinitätsrezeptoren, den Heparansulfat-Proteoglykanen, die an der Ausbildung eines Ternärkomplexes beteiligt sind und die Aufnahme von extrazellulärem FGF fördern. Eine weitere Möglichkeit für das Vorhandensein von extrazellulärem FGF beruht auf der Annahme, dass intrazelluläres FGF durch die Zerstörung von Zellen freigesetzt wird und so die verbliebenen Zellen durch Stimulation eine bessere Überlebenschance bzw. Förderung der Wundheilung erhalten.

Zur Übertragung des Gens für den Wachstumsfaktor aFGF in HCEC wurden die für jedes TR ermittelten optimalen Gentransferbedingungen eingesetzt. Mit Hilfe der Liposomen DAC-30 und Lipofectin konnte die Proliferation der HCEC gesteigert werden. Protaminsulfat konnte zwar in Verbindung mit DAC-30 dessen Gentransfereffizienz verbessern, die Proliferation der HCEC wurde jedoch nicht in gleichem Maße erhöht. Auch Lipofectin, das die höchste Gentransfereffizienz unter den getesteten Lipiden erreichte, blieb bei der Proliferationssteigerung der Zellen hinter DAC-30 zurück, welches die geringste Gentransfereffizienz erzielt hatte. Mit DMRIE-C, Effectene und Fugene konnte nahezu keine proliferationsfördernde Wirkung durch aFGF-Gentransfer beobachtet werden.

Unsere Expressionsuntersuchungen nach Gentransfer von aFGF zeigten, dass das Protein zwar in allen transfizierten Zellen nachweisbar war, jedoch in unterschiedlicher Quantität. In mit Lipofectin transfizierten Zellen lag aFGF in den größten Mengen vor, gefolgt von DAC-30 + PS und DAC-30. Eine geringe Expression des Wachstumsfaktors konnte in den Zellen, die mit DMRIE-C, Effectene und Fugene transfiziert worden waren, detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine dosisabhängige Wirkung von aFGF schließen. Lipofectin und DAC-30 + PS, die bessere Gentransfereffizienzen als DAC-30 erreichten, bilden das Protein auch in entsprechender Menge, stimulieren jedoch die Proliferation der Zellen nicht in dem Maße wie DAC-30. Es scheint also für die Wirkung von aFGF eine Höchstdosis zu geben,



die stimulierend auf die Zellproliferation wirkt. Mengen, die darüber hinausgehen, können auf diese Weise wieder abnehmende Effekte bewirken. Dies wird durch Studien mit bFGF, dem nahe verwandten basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor, bestätigt. Rieck et al., (1995) konnten nachweisen, dass primär kultivierte HCEC auf die Gabe von exogenem bFGF bis zu einer bestimmten Dosis, ihre Proliferation steigerten und bei weiter erhöhten Mengen des Wachstumsfaktors eine Hemmung dieses Prozesses eintrat. Diese Beobachtungen könnten durch eine Herunter-Regulation von FGF-Hoch- und -Niedrig-Affinitäts-Rezeptoren erklärt werden (Ornitz et al., 1992, Mascarelli et al., 1993). Durch den Einsatz von anti-FGF Rezeptor-1 Antikörpern könnte diese Interpretation in weiterführenden Studien untermauert werden. Auch Nabel et al. (1993) zeigten, dass relativ geringe Effizienzen für eine erfolgreiche Sekretion von aFGF und damit verbundene messbare Effekte ausreichend sind.

#### **4.1.1.4 Beeinflussung des nicht-viralen Gentransfers durch Ladungsunterschiede und Helfer-Lipid**

In unseren Experimenten wurden klassische monovalente Liposomen (DAC-30, Lipofectin, DMRIE-C) und neu entwickelte Lipidformulationen (Fugene, Effectene) eingesetzt. Einige Studien demonstrieren erhöhte Transfektionsaktivitäten bei einem Einsatz multivalenter gegenüber monovalenten Liposomen (Behr, et al., 1989, Hawley-Nelson et al., 1993, Pleyer et. al., 2001b). In unseren Untersuchungen erwies sich das multivalente Liposom Lipofectamine, verglichen mit den monovalenten Liposomen, als hochtoxisch. Abul-Hassan et al. (2000) teilten ähnliche Beobachtungen an retinalen Pigment-Epithelzellen mit. So wurden auch in dieser Studie mit Lipofectin deutlich bessere Transfektionseffizienzen als mit Lipofectamine erzielt. Desweiteren konnte auch die geringere Transfektionseffizienz von DMRIE-C bestätigt werden. In unseren Untersuchungen zeigte DMRIE-C zwar eine gute Transfektionseffizienz, blieb aber bei der aFGF-Expression (Western Blot) hinter den beiden anderen monovalenten Liposomen (Lipofectin, DAC-30) zurück und zeigte keinerlei proliferationsteigernden Effekt nach aFGF-Gentransfer. Eine Erklärung dafür sind die unterschiedlichen Helferlipide, die in den verschiedenen Liposomenherstellungen enthalten sind (siehe Tabelle 2). Neutrale Helferlipide wie DOPE oder Cholesterol werden oftmals bei der Herstellung von Lipidformulationen zur Verbesserung der Gentransfereffizienz eingesetzt. Für DOPE wird angenommen, dass es die Freisetzung der Lipoplexe aus den Endosomen fördert, da es die Eigenschaft besitzt, Membranfusionen zu verursachen. Dies geschieht durch eine strukturelle Umwandlung einer stabilen Doppelschicht-Phase in eine instabile fusogene Phase bei endosomalem pH-Wert (Felgner et al., 1994, Zhou und Huang 1994, Farhood et al., 1995). Dadurch kann die kationische Doppelschicht der Lipoplexe mit

der anionischen Doppelschicht des Endosoms fusionieren, wobei die verbleibenden Lipoplexe ins Zytoplasma freigesetzt werden. Cholesterol dagegen neigt dazu, Lipid-Doppelschichten zu verstärken (Regelin et al., 2000).

Lipofectin und DAC-30 enthalten mit 50 % bzw. 70 % das Helferlipid DOPE, während DMRIE-C zu 50 % aus Cholesterol besteht. So liegt die Vermutung nahe, dass Cholesterol als Helferlipid einen limitierenden Faktor für die effiziente Übertragung des aFGF-Gens in HCEC darstellt.

Bei Fugene handelt es sich um eine sogenannte Multi-Komponenten-Lösung auf Lipid-Basis. Die genaue Zusammensetzung ist nur dem Hersteller bekannt. Der aFGF-Gentransfer mit Hilfe von Fugene führte nur zu einer geringen Proliferationsteigerung an Tag 4, die zum Tag 7 hin nicht mehr nachweisbar war. Effectene ist ein nicht-liposomales Lipid und führte zu keiner nachweisbar erhöhten Proliferation nach aFGF-Gentransfer. Thanh et al. (2002) nutzten Fugene zur Übertragung des Reportergens GFP in korneale Endothelzellen des Kaninchens. Sie demonstrierten eine 30 %ige Gentransfereffizienz am dritten Tag nach Transfektion. In unserer Studie wurde die Gentransfereffizienz des Markergentransfers bereits 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. In der Studie von Thanh et al. (2002) konnten ansteigende Fluoreszenzintensitäten von Tag 1 bis Tag 3 nachgewiesen werden, was die Unterschiede zwischen beiden Untersuchungen erklären könnte. An den Tagen 3-5 blieb die Fluoreszenzintensität konstant und schwächte sich anschließend ab, was durch den transienten Gentransfer bedingt war. In unserer Studie sahen wir einen ähnlichen Effekt nach Gentransfer von aFGF, der an Tag 4 seine größte Wirkung zeigte und zum Tag 7 hin sowohl in der Expression als auch in der Wirkung auf die Zellproliferation nachließ.

#### **4.1.1.5 Die extrazelluläre Matrix und ihr Einfluss auf die Wirkung von aFGF**

Obwohl die Transfektionseffizienzen und Toxizitäten der getesteten TR in einem ähnlichen Bereich lagen, war der Effekt des aFGF-Gentransfers auf die HCEC-Proliferation sehr unterschiedlich und reichte von nahezu keiner Wirkung bis zu einer Erhöhung, die ähnlich der Zugabe von 10ng exogenem aFGF war. Wie schon weiter oben erörtert, scheint die Zusammensetzung der Lipide einen Einfluss auf den Erfolg des aFGF-Gentransfers auszuüben. Es gibt Untersuchungen, die zu der Erkenntnis führten, dass die Transfektion kationischer Lipide von Zell-Oberflächen-Proteoglykanen abhängig ist (Belting und Petersson, 1999). Aufgrund ihrer polyanionischen Natur und Assoziation mit der Zellmembran, sind Proteoglykane potentielle Kandidaten für die Bindung und Aufnahme von positiv geladenen kationischen Liposomen und polybasischen Peptiden. Gleichzeitig sind Heparansulfat-Proteoglykane, als fundamentale Komponenten von Zelloberflächen und der

extrazellulären Matrix, Regulatoren von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. So spielt Heparansulfat, durch direkte Assoziation mit FGF und FGF-Rezeptor in einem Ternärkomplex auf der Zelloberfläche, eine essentielle Rolle in der FGF-Signaltransduktion (Ornitz, 2000). Rieck et al. (1995) konnten zeigen, dass FGF-2 in der extrazellulären Matrix vorliegt und diese matrixgebundene Form von FGF-2 einen stimulierenden Einfluss auf das zelluläre Wachstum und Überleben von primär kultivierten HCEC ausübt.

Die toxischen Effekte der Lipide wurden bereits 24 Stunden nach Gentransfer untersucht. Die Zytotoxizität von Lipid:DNA-Komplexen findet jedoch nicht nur durch einen akuten toxischen Effekt auf die Zellmembran Ausdruck, sondern auch durch die Aufnahme der Transfektionskomplexe in die Zelle und die nachfolgende Genexpression (Uchida et al., 2002). Dies wird durch unsere elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegt, in denen Fugene noch 7 Tage nach aFGF-Gentransfer zu Zellschäden führte, obwohl Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten eine sehr geringe Toxizität für Fugene ergeben hatten.

Belting und Petersson (1999) konnten eine protektive Rolle von Heparansulfat-Proteoglykanen gegen die durch kationische Liposomen vermittelte Zytotoxizität in Ovarienzellen chinesischer Hamster belegen. So war die Aufnahme der Transfektionskomplexe in Zellen, die keine Proteoglykane bilden nicht eingeschränkt, während die Expression des übertragenen Reportergens und die Zellproliferation bei höheren Lipid-Konzentrationen stark vermindert waren. Proteoglykan-haltige Zellen zeigten dabei eine uneingeschränkte Reportergen-Expression. Dies zeigt, dass Proteoglykan-defiziente Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber toxischen Effekten durch kationische Liposomen aufweisen und dass Heparansulfat-Proteoglykane Zellen gegen diese toxischen Effekte schützen können. Durch Bindung von kationischen Liposomen könnten Heparansulfat-Proteoglykane also deren toxische Effekte mildern, stehen dann aber nicht mehr für die FGF-Signaltransduktion zur Verfügung. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass beim Einsatz größerer Lipidkonzentrationen (DMRIE-C 2,5µg; Effectene 2,5µg; Fugene 6µl) im Vergleich zu geringeren Mengen (Lipofectin 1,25µg; DAC-30 1µg; DAC-30 + PS 1µg), aFGF keinen Einfluss auf die Proliferation nehmen kann, da die Niedrig-Affinitäts-Rezeptoren für die FGF-Signaltransduktion nicht zur Verfügung stehen.

## **4.2 Gentransfer in der Keratoplastik**

### **4.2.1 Viraler Gentransfer in das Hornhautendothel**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine lokale Überexpression der immunmodulatorischen Zytokine vIL-10 und rIL-4 in kornealen Transplantaten zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führen kann. Für den Gentransfer wurden in diesem Fall zunächst adenovirale Vektoren eingesetzt. Etliche Arbeiten belegen die Fähigkeit adenoviraler Vektoren, das korneale Endothel verschiedenster Spezies effektiv zu transduzieren (Budenz et al., 1995, Larkin et al., 1996, Borrás et al., 1996, Oral et al., 1997, Ritter et al., 1999a). Der Vorteil adenoviraler Vektoren gegenüber Liposomen liegt in ihrer wesentlich höheren Gentransfereffizienz und der damit verbundenen hohen Genexpression.

Aufgrund von Untersuchungen im Tiermodell konnte die bedeutende Rolle von T-Lymphozyten bei der Abstoßung kornealer Transplantate belegt werden (Pleyer et al., 1995). Insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sich aufgrund ihrer Zytokinsekretion in zwei unterschiedliche T-Helfer Subpopulationen (Th1- und Th2-Zellen) unterteilen lassen, nehmen Einfluss auf den Verlauf von Abstoßungsreaktionen. Die Analyse von Th1- und Th2-Zytokinprofilen transplantiert Organe erlaubt Rückschlüsse auf die Immunbiologie des transplantierten Organs. Während die Expression von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN- $\gamma$ ) im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen gesehen wird (Dallman, 1993), scheinen Th2-Antworten keinen schädigenden Einfluss auf das Transplantat auszuüben. Vorangegangene Untersuchungen der Zytokinexpressionsmuster nach Keratoplastik zeigen, dass dies auch für die Kornea gilt (Torres et al., 1996, Sano et al., 1998, Yamagami et al., 1998). Bei der kornealen Abstoßung konnten von Torres et al. (1996) IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA nachgewiesen werden, was die dominante Rolle der Th1-Zytokine für die Transplantatabstoßung belegt. Auch Yamada et al. (1999) konnten diese Zytokine im Kammerwasser sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Dies verdeutlicht die Rolle dieser pro-inflammatorischen Zytokine bzw. der produzierenden Zellen als Effektoren der kornealen Abstoßung, denn sie wurden nur in abgestoßenen Transplantaten nachgewiesen. Eine Hemmung der Th1-Antworten könnte deshalb von besonderem Interesse für die Modulation der Immunreaktion gegen korneale Transplantate sein.

Zudem wirken Th1- und Th2-Zytokine als Wachstumsfaktoren für die eigene Zellpopulation und gleichzeitig als Inhibitoren auf den anderen Zelltyp (Gajewski und Fitch, 1988). Aus diesem Grund wurden immunmodulatorische Th2-Zytokine, zu denen auch IL-10 und IL-4

gehören, in verschiedenen Transplantationsmodellen eingesetzt, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg.

Larkin et al. (1996) konnten zeigen, dass der adenovirale Gentransfer in Hornhäute auf das korneale Endothel beschränkt ist und das Reportergen *ex vivo* stabil über einen längeren Zeitraum exprimiert wird. Auch Ritter et al. (1999a) zeigten, dass die Expression von IL-4 nach AdrIL-4-Transduktion von Ratten-Hornhäuten früh einsetzt und über mindestens 6 Tage anhält. Demgegenüber stehen *in vivo*-Untersuchungen, die zeigen, dass bereits 4 Tage nach Gentransfer und Transplantation der Hornhäute keine Expression mehr nachweisbar zu sein scheint (Larkin et al., 1996).

Der Hauptvorteil der Gentransfermethoden gegenüber exogener Applikation von Zytokinen liegt darin, dass die kurze Halbwertszeit und die damit verbundene stark begrenzte Bioverfügbarkeit (Ma et al., 1996) durch kontinuierliche Sekretion in das transplantierte Organ umgangen werden kann, wobei zusätzlich die, bei systemischer Applikation auftretenden, Nebenwirkungen verhindert werden können. Ohne Immunsuppression erfolgt die Abstoßung kornealer Transplantate im Rattenmodell (WF auf Lew) nach ca. 10 Tagen (Dr. J. Yang, persönliche Mitteilung). Die Expression des therapeutischen Gens (IL-12p40) konnte in seiner Studie über mindestens 14 Tage in *ex vivo* kultivierten Korneae nachgewiesen werden. Aus diesem Grund scheint die Verwendung adenoviraler Vektoren zur Übertragung und Expression von Zytokinen in kornealen Transplantaten, eine gute Möglichkeit für die Modulation von Abstoßungsreaktionen zu sein, wenn es gelingt, auch *in vivo* eine entsprechend lange Zytokinenexpression zu erreichen.

#### **4.2.1.1 Einsatz der immunmodulatorischen Zytokine vIL-10 und rIL-4 in Transplantationsmodellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des adenoviralen und liposomalen Gentransfers zwei verschiedene Zytokingene in *ex vivo*-kultivierte Korneae übertragen. Dabei handelte es sich um vIL-10 und um die Kombination von vIL-10 und rIL-4. Auch in Modellen von Herz- (Qin et al., 1997a, Guillot et al., 1999, Ke et al., 2000, David et al., 2000) und Nierentransplantationen (Kato et al., 2000, Yang et al., 2003) sowie bei der Keratoplastik (Pleyer et al., 2000, Klebe et al., 2001) kam ihre Expression über adenovirale Vektoren bereits zur Anwendung.

Der Einsatz von IL-4 ermöglichte ein verlängertes Überleben in Haut-, Nieren- und Herztransplantationsmodellen (Mottram et al., 1995, Takeuchi et al., 1997, He et al., 1998). Dabei führte sowohl die lokale Überexpression, als auch eine systemische Applikation von IL-4 zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens (Takeuchi et al., 1997, He et al.,

1998). Auch ein synergistischer Effekt von IL-4 und IL-10 im Nierentransplantationsmodell der Ratte bei der Verlängerung der Transplantatakzeptanz war nachweisbar, interessanterweise nachdem in diesem starken Abstoßungsmodell (WF auf Lew) IL-4 allein keinen Effekt erzielt hatte (Kato et al., 1999). Im Keratoplastikmodell konnte nach Übertragung des IL-4-Gens mit adenoviralen Vektoren im gleichen Rattenmodell (WF auf Lew) ebenfalls keine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt werden (Pleyer et al., 2000). Ritter et al. (1999b) zeigten, dass IL-4 weder ausreichend noch notwendig für die Toleranzinduktion in Herztransplantationsmodellen ist. Der Grund dafür ist unklar. Möglicherweise tritt *in vivo* eine Inaktivierung des Promotors auf. Es wird spekuliert, dass u.a. Zytokine an der schnellen Herunterregulation des therapeutischen Gens beteiligt sind (Stein et al., 1993, Qin et al., 1997b, Ritter et al., 2000, Sung et al., 2001). Qin et al. (1997b) konnten diesen Effekt für die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nachweisen, deren Expression durch spezifische und unspezifische Immunreaktionen gegen virale Promotoren/Enhancer ausgelöst wird. Möglicherweise könnte die Expression anti-inflammatorischer oder Th2-Zytokine diesen Effekt verhindern. Eine wirkungsvolle Alternative wäre auch die Verwendung nicht-viraler Promotoren. Außerdem spielt die Dosis des Zytokins (David et al., 1997) sowie der genetische Hintergrund und das Alter des Empfängers eine Rolle bei der Toleranzinduktion. Gentransfer von IL-10 in Allotransplantationsmodellen beeinträchtigt die effektive Antigen-Präsentation, reduziert die Immunogenität des Transplantats und hemmt Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz zu zellulärem IL-10 zeigt das Epstein-Barr-Virus (EBV) kodierte IL-10-Homolog (vIL-10) nur diese immunsuppressiven Eigenschaften, jedoch keine stimulatorischen Effekte auf natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen (Qin et al., 1997a). Aus diesem Grund ist vIL-10 als wirkungsvolleres Immunsuppressivum anzusehen.

Gentransferuntersuchungen mit vIL-10 führten im Herztransplantationsmodell zu einem verlängerten Transplantatüberleben, auch in starken Abstoßungsmodellen (Zuo et al., 2001). Bei der Keratoplastik gelang es Klebe et al. (2001) im Schafsmodell, ein verlängertes Überleben der mit IL-10 adenoviral transduzierten Hornhauttransplantate zu erzielen. Im Gegensatz dazu steht die Studie von Torres et al. (1999). Die Autoren konnten nach Injektion von rekombinantem murinem IL-10 (subconjunctival, intraperitoneal) im Rattenmodell keine Verlängerung des Transplantatüberlebens verzeichnen.

Die Wirkung von IL-10 und vIL-10 scheint dosis- und zeitabhängig zu sein (Blazar et al., 1998). So besteht die Möglichkeit, dass die Expression des therapeutischen Gens zu hoch oder zu gering ist und dadurch ein gegenteiliger Effekt erzielt wird.

#### 4.2.2 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit nach adenoviralem und liposomalem vIL-10-Gentransfer im Rattenmodell nachgewiesen werden. Ebenso wenig bei der kombinierten Anwendung von adenoviral kodiertem vIL-10 und rIL-4.

Da im vIL-10-Versuch der Einsatz des Kontrollvektors Ad0 zu einer längeren Transplantatüberlebenszeit führte als der therapeutische Vektor, wurde für den kombinierten Gentransfer von vIL-10 und rIL-4 das Ad $\beta$ -gal-Konstrukt als Kontrollvektor verwendet. Ad0 ist zwar als besserer Kontrollvektor anzusehen, da er als Leervektor nur adenovirale Bestandteile ohne zusätzlich inseriertes Gen enthält. Allerdings scheint dieser Vektor anti-apoptotische Eigenschaften zu besitzen. Dies könnte auf der nicht-deletierten E3-Region beruhen. Aus der E3-Region von Adenoviren werden mehrere mRNA-Transkripte generiert, die für Proteine kodieren, welche die Antigen-Präsentation auf infizierten Zellen und die Zytokin-induzierte Apoptose dieser Zellen verhindern (Wold und Gooding, 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von E3-Genen in pankreatischen Insel- $\beta$ -Zellen transgener Mäuse das Überleben von Inselzell-Transplantaten verlängerte (Efrat et al., 1995). Zudem konnte in einem diabetischen Mausmodell die Häufigkeit der Krankheit verringert und ihre Entwicklung verzögert werden (Efrat et al., 2001). Bei den eingesetzten adenoviralen Therapiegen-Vektoren handelte es sich um E1/E3-deletierte Vektoren. So wurde im zweiten Versuchsansatz Ad $\beta$ -gal als Kontrollvektor verwendet, der ebenfalls keine E1/E3-Region mehr besitzt.

Die Resultate zur Transplantat-Überlebenszeit nach adenoviralem Gentransfer fanden durch die Ergebnisse der gemischten Lymphozytenkultur am Tag der Abstoßung und am Tag 10 nach Transplantation Bestätigung. Ziel dieses Versuchsansatzes war es, mehr über die Mechanismen zu erfahren, die bei Transplantatakzeptanz bzw. -abstoßung eine Rolle spielen. So wurde überprüft, ob durch den lokalen Gentransfer eine regionale und/oder systemische Immunmodulation erzielt werden kann. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich (Abb. 20b + 21), wurde durch den adenoviralen Gentransfer des immunmodulatorischen Zytokins vIL-10 keine Modulation der Proliferation von lokalen (Lymphknoten) und systemischen (Milz) Lymphozyten erreicht. Die am Tag der Abstoßung erhöhte Proliferation der adenoviral behandelten, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren könnte durch einen Kontakt der Spendertiere für die Stimulatorzellen mit Adenoviren ausgelöst worden sein (Abb. 20).

Die Ergebnisse des adenoviralen Zytokin-Gentransfers, die in dieser Arbeit generiert wurden und die durch den lokalen liposomalen Gentransfer bestätigt werden konnten, sind ein

weiterer Hinweis dafür, warum der lokale Gentransfer von vIL-10 nicht funktionieren kann. Sie lassen vermuten, dass das therapeutische Genprodukt von der transduzierten Kornea nicht in die regionalen Lymphknoten gelangen kann, was möglicherweise eine Voraussetzung für eine Immunmodulation wäre. So wird die allogene Immunantwort nicht ausschließlich im transplantierten Organ initiiert, sondern auch in den sekundären lymphatischen Organen. Es wäre somit denkbar, dass eine lokale Genexpression ausschließlich im Transplantat keinen Einfluss auf die immunologische Aktivierung der T-Zellen in den regionalen Lymphknoten nimmt, sodass es trotzdem zu einer Abstoßung des Organs kommen kann.

Die korneale Abstoßung wird von dem indirekten Weg der Allogenerkennung dominiert, da in der Kornea nur wenige dendritische Zellen vorhanden sind. Der indirekte Weg hängt von Antigen-präsentierenden Zellen in der Kornea und den drainierenden Lymphknoten ab. Boisgerault et al. (2001) konnten die kritische Rolle der drainierenden Lymphknoten bei der Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen belegen, d.h., dass diese Aktivierung verhindert werden sollte, um ein Transplantatüberleben erreichen zu können. Die Übertragung immunregulatorischer Moleküle in korneale Transplantate ohne eine Manipulation der drainierenden Lymphknoten ist so wahrscheinlich nicht ausreichend für die Vermeidung des Abstoßungsprozesses. In der Studie von Yang et al. (zur Veröffentlichung eingereicht) wurde das immunregulatorische Zytokin IL-12p40 zur lokalen Überexpression in kornealen Transplantaten eingesetzt. Dabei konnte eine reduzierte Infiltration von T-Zellen in das Transplantat, sowie eine verminderte Th1-Zytokinfreisetzung beobachtet werden. Auch in der vorliegenden Studie konnte die frühe Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Expression von vIL-10 im Transplantat verringert werden (Abb. 22, 23). Dieser Effekt war jedoch nur von kurzer Dauer und konnte die Transplantatüberlebenszeit nicht entscheidend beeinflussen.

In beiden Studien war die Expression der immunmodulatorischen Zytokine nicht ausreichend, um das Transplantatüberleben zu verlängern. Die Modifikation der drainierenden Lymphknoten könnte ein wichtiger Schritt zu einem verbesserten Transplantationsergebnis sein. Diese Hypothese wird auch durch Untersuchungen von Rayner et al. (2001) unterstützt. TNF- $\alpha$  ist ein anderer wichtiger Mediator von Abstoßungsreaktionen. Durch adenovirale Überexpression eines löslichen TNF-Rezeptors im kornealen Transplantat konnte jedoch ebenfalls keine Verbesserung des Transplantatüberlebens erzielt werden.

Ein weiterer kritischer Punkt, durch den der Erfolg des lokalen Gentransfers möglicherweise beschränkt wird, ist das Erreichen der Zytokin-Dosis, die für eine Beeinflussung der T-Zellen erforderlich wäre. Somit bleibt zu überprüfen, ob die systemische Applikation von vIL-10



Erfolge bei der Verlängerung der Transplantatakzeptanz in der Keratoplastik bringen kann. Erste Untersuchungen dazu zeigten tatsächlich einen immunmodulatorischen Effekt bei intraperitonealer Applikation von vIL-10 in dem von uns verwendeten Rattenmodell (PD Dr. T. Ritter, persönliche Mitteilung). Die Applikation des Vektors erfolgte hier bereits einen Tag vor Keratoplastik. Somit liegt nahe, dass auch der Zeitpunkt der Applikation, wahrscheinlich im Hinblick auf eine wirkungsvolle Zytokindosis, einen entscheidenden Einfluss auf den Transplantationserfolg nehmen kann. Daraus würde sich ergeben, dass der lokale Gentransfer nicht funktionieren kann, wenn der Zeitpunkt der Applikation des Vektors mit der Transplantation zusammenfällt. Hier könnten neue Ansätze greifen, die auch eine lokale Applikation des Vektors bereits vor Transplantation ermöglichen, im Fall der Keratoplastik z.B. durch Injektion des Vektors in die Augenvorderkammer oder den Glaskörper des Auges (Abraham et al., 1995).

### 4.3 Fazit und Ausblick

Die genauen Mechanismen, die dem Endothelzellverlust während der Hornhautkonservierung und nach Transplantation zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig verstanden. Jedoch zeigte sich der Einsatz des aFGF-Gentransfers *in vitro* als vielversprechende Möglichkeit, die Endothelvitalität durch Proliferationsförderung der transfizierten Zellen zu erhöhen. Die Liposomen DAC-30 und Lipofectin haben sich bei der Übertragung von aFGF als gute Transportvehikel gezeigt, wenn auch die Gentransfer-Effizienz gering ist und aufwändige Voruntersuchungen nötig sind, um die optimalen Gentransferbedingungen für jedes Liposom festzulegen. In weiterführenden Studien sollte sich die Testung dieses Wachstumsfaktors an humanen Hornhäuten anschließen. Hier wäre es denkbar, dass sowohl die Endotheldichte vor Transplantation verbessert, als auch durch gentherapeutische Maßnahmen einem Endothelzellverlust nach Transplantation vorgebeugt werden kann. Damit könnte die Prognose für den Transplantationserfolg deutlich verbessert werden. Für beide Ansätze wäre eine vorübergehende Expression des Wachstumsfaktors ausreichend, wie sie durch Liposomen, aber auch durch adenovirale Vektoren erreicht wird.

Die lokale Überexpression von Zytokinen zur Modulation der Immunreaktion nach Keratoplastik zeigte in dieser Arbeit weder nach adenoviraler noch liposomaler Applikation Erfolg. Als mögliche Gründe dafür wurden der Ort und der Zeitpunkt der Applikation des therapeutischen Vektors, sowie die Zytokindosis diskutiert.

Neben der Überexpression von Zytokinen im Transplantat stellt auch der Einsatz von Molekülen, die Signal 2 der T-Zellaktivierung modulieren, einen interessanten Therapieansatz

dar. CTLA4-Ig kann die allogene Transplantatabstoßung verhindern, allerdings gelang dies bei der Kornea nur nach systemischer Applikation. Hier sollte bemerkt werden, dass adenovirale Vektoren für die systemische Applikation nur unter Vorbehalt einsetzbar sind. Es ist bekannt, dass diese Vektoren toxische und immunaktivierende Effekte auslösen können (Kay et al., 2001).

So kann es selbst nach lokaler Applikation zu einer nicht-spezifischen Immunantwort gegen die adenoviralen Bestandteile kommen (Yang et al, zur Veröffentlichung eingereicht). Dies könnte den Nutzen der durch die übertragenen immunregulatorischen Moleküle erzielt werden kann, stark beschränken. Eine Alternative dazu wäre der Einsatz von Adenoviren der 2. und 3. Generation, bei denen weitere virale Gene entfernt wurden und die aus diesem Grund zu einer deutlich verlängerten Genexpression und zu reduzierten Entzündungsreaktionen führen (Kay et al., 2001). Auch das Ausweichen auf weniger immunogene Vektorsysteme, wie Lentiviren, Adenoassoziierte Viren oder Liposomen wäre denkbar, allerdings besteht hier das Problem der geringeren Gentransfereffizienz.

Der Einsatz anti-apoptotischer und zytoprotektiver Gene, wie HO-1 oder bcl-2 und bag-1 wurde in neueren Studien untersucht und zeigte sich sehr wirkungsvoll bei der Verlängerung von Transplantatüberlebenszeiten (Ke et al., 2002, Sawitzki et a., 2002). Auch der Wachstumsfaktor aFGF verfügt über zellprotektive Eigenschaften und so wäre in weiterführenden Untersuchungen sein *in vivo*-Einsatz zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit durch Verhinderung von Endothelzellverlusten nach Transplantation denkbar.

Die genetische Manipulation von Effektorzellen der Immunantwort bzw. der drainierenden Lymphknoten stellt ebenfalls einen interessanten Ansatz zur Verhinderung der Transplantatabstoßung dar.

Wahrscheinlich bietet eine Kombination aller besprochenen Strategien die vielversprechendste Aussicht auf Erfolg. Im Spezialfall der Keratoplastik betrifft dies vor allem den Schutz des empfindlichen Endothels, dessen Vitalität eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Hornhauttransplantation darstellt.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAID	Anterior Chamber Associated Immune Deviation, Vorderkammer-Immunprivileg
Ad	Adenovirus
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
β-gal	Beta-Galaktosidase
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsgruppen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFDA-SE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CMV	Zytomegalievirus
CTLA4-Ig	Immunglobulin-Fusionsprotein mit dem „Zytotoxische T-Lymphozyten“-Antigen 4
DAC	DAC-30
DLKI	drainierende Lymphknoten links
DLKr	drainierende Lymphknoten rechts
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin
DPS	DAC-30 + Protaminsulfat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTH	delayed type hypersensitivity, Hypersensitivität des verzögerten Typs
DZ	dendritische Zelle
EF	Effectene
EGFP	Enhanced Green fluorescence protein, verstärktes grün-fluoreszierendes Protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay, enzymatischer Protein-Detektionstest
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FGF	Fibroblast Growth Factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HCEC	humane korneale Endothelzellen
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
Lew	Lewis-Ratte
LF	Lipofectin
LFA	Lipofectamine
LHZ	Langerhans-Zelle
LK	Lymphknoten
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
M	Molar
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
μm	Mikrometer
MØ	Makrophage
mAb	monoklonaler Antikörper
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction, gemischte Lymphozyten Reaktion
Mz	Milz
n.d.	nicht detektierbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PBS	Phosphat buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

Pfu	plaque forming unit
PI	Propidium Iodid
PO	Peroxidase
post-Tx	nach Transplantation
PS	Protaminsulfat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, Boten-RNA
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunde
SF	Superfect
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta, transformierender Wachstumsfaktor beta
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TR	Transfektionsreagenz
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
vIL-10	virales Interleukin-10
WF	Wistar-Furth-Ratte
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Literaturverzeichnis

- Abelsira-Amar O, Gibert M, Jolij M, Theze J, Jankovic DL (1992). IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J Immunol.*;148:3820-3829.
- Aboalchamat B, Engelmann K, Böhnke M, Eggli P, Bednarz J (1999). Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res.*;69:547-553.
- Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*;5:2523-2528.
- Abraham NG, da Silva JL, Lavrovsky Y, Stoltz RA, Kappas A, Dunn MW, Schwartzman ML (1995). Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer into rabbit ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;36:2202-2210.
- Abul-Hassan K, Walmsley R, Boulton M (2000). Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.*;20:361-366.
- Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME (2000). Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41:2887-2893.
- Allredge OC, Krachmer JH (1981). Clinical types of corneal transplant rejection. Their manifestations, frequency, preoperative correlates, and treatment. *Arch Ophthalmol.*;99:599-604.
- Arancibia-Cárcamo CV, Oral HB, Haskard DO, Larkin DF, George AJ (1998). Lipoadenofection-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplantation.*;65:62-67.
- Assouline M, Hutchinson C, Morton K, Mascarelli F, Jeanny JC, Fayein N, Pouliquen Y, Courtois Y (1989). In vivo binding of topically applied human bFGF on rabbit corneal epithelial wound. *Growth Factors.*;1:251-261.
- Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K (2000). Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimised for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand.*;78:130-136.
- Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989). Efficient gene transfer in mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*;86:6982-6986.
- Belting M, Petersson P (1999). Protective role for proteoglycan against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro. *Biochem J.*;342:281-286.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.*;275:1320-1323.
- Blair-Parks K, Weston BC, Dean DA (2002). High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med.*;4:92-100.
- Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Narula SK, Smith SR, Roncarolo MG, Vallera DA (1998). Interleukin-10 dose-dependent regulation of CD4+ and CD8+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *Transplantation.*;66:1220-1229.
- Boisgerault F, Liu Y, Anosova N, Ehrlich E, Dana MR, Benichou G (2001). Role of CD4+ and CD8+ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *J Immunol.*;167:1891-1899.
- Borras T, Tamm ER, Zigler Jr JS (1996). Ocular adenovirus gene transfer varies in efficiency and inflammatory response. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;37:1282-1293.
- Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO (1997). Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;38:779-782.
- Brandt C (2003). Retroviral modifizierte, alloantigen-spezifische und vIL-10 transgene T-Lymphozyten als therapeutischer Ansatz im akuten Abstoßungsmodell. Dissertation.
- Bron AJ, Tripathi DM, Tripathi BJ (1997). Wolff's anatomy of the eye and orbit, 8th edition. Chapman & Hall Medical, London.

- Budenz DL, Bennett J, Alonso L, Maguire A (1995). In vivo gene transfer into murine corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;36:2211-2215.
- Callanan D, Peeler J, Niederkorn JY (1988). Characteristics of rejection of orthotopic corneal allografts in the rat. *Transplantation.*;45:437-443.
- Caruelle D, Groux-Muscattelli B, Gaudric A, Sestier C, Coscas G, Caruelle JP, Barritault D. (1989). Immunological study of acidic fibroblast growth factor (aFGF) distribution in the eye. *J Cell Biochem.*;39:117-128.
- Chen R, Greene EL, Collinsworth G, Grewal JS, Houghton O, Zeng H, Garnovskaya M, Paul RV, Raymond JR. (1999). Enrichment of transiently transfected mesengial cells by cell sorting after cotransfection with GFP. *Am J Physiol.*;276:F777-F785.
- Chomarat P, Banchereau J (1997). An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw.*;8:333-344.
- Claerhout I (2004). Role of NK cells in rat corneal allograft rejection. *Transplantation.*; in press.
- Comer RM, King WJ, Ardjomand N, Theoharis S, George AJ, Larkin DF (2002). Effect of administration of CTLA4-Ig as protein or cDNA on corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;43:1095-1103. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;43:1701.
- Coupland SE, Krause L, Karow AC, Bartlett RR, Lehmann M, Hoffmann F (1995). Delay in corneal allograft rejection due to anti-CD4 antibody given alone and in combination with cyclosporin A and leflunomide. *Ger J Ophthalmol.*;4:294-301.
- Cua DJ, Coffman RL, Stohlman SA (1996). Exposure to T helper 2 cytokines in vivo before encounter with antigen selects for T helper subsets via alterations in antigen-presenting cell function. *J Immunol.*;157:2830-2836.
- Dabin I, Courtois Y (1991). Acidic fibroblast growth factor overexpression in corneal epithelial wound healing. *Growth Factors.*;5:129-139.
- Dallman MJ, Larsen CP, Morris PJ (1991). Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med.*;174:493-497.
- Dallman MJ (1993). Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Curr Opin Immunol.*;5:788-793.
- Dana MR, Yamada J, Streilein JW (1997). Topical interleukin 1 receptor antagonist promotes corneal transplant survival. *Transplantation.*;63:1501-1507.
- David A, Chetrit J, Coupel-Clauce H, Tesson L, Cassard A, Blancho G et al (1997). Adenovirus-mediated gene transfer in rat liver of interleukin 4 but not interleukin 10 produces severe acute hepatitis. *Cytokine.*;9:818-829.
- David A, Coupel-Clauce H, Chetrit J, Tesson L, Cassard A, Charreau B, Soulillou JP, Anegon I. (1998). Anti-adenovirus immune responses in rats are enhanced by interleukin-4 but not interleukin-10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther.*;9:1755-1768.
- David A, Chetrit J, Guillot C, Tesson L, Heslan JM, Cuturi MC, Soulillou JP, Anegon I (2000). Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene Ther.*;7:505-510.
- deVries JE (1995). Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med.*;27:537-541.
- deWaal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, deVries JE (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.*;174:915-924.
- deWaal Malefyt R, Moore KW (1998). Interleukin-10. In Angus T (ed.) *The cytokine handbook*. Academic press: London pp333-364.
- Doebis C, Ritter T, Brandt C, Schonberger B, Volk HD, Seifert M (2002). Efficient in vitro transduction of epithelial cells and keratinocytes with improved adenoviral gene transfer for the application in skin

- tissue engineering. *Transpl Immunol.*;9:323-329.
- EBAA (2002). Eye bank association of america. [www.restoresight.org](http://www.restoresight.org)
- Efrat S, Fejer G, Brownlee M, Horwitz MS (1995). Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92:6947-6951.
- Efrat S, Serreze D, Svetlanov A, Post CM, Johnson EA, Herold K, Horwitz M (2001). Adenovirus early region 3(E3) immunomodulatory genes decrease the incidence of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.*;50:980-984.
- Engelmann K, Böhnke M (1990). Human corneal endothelial cells in long-term cultures: The influence of conditions for isolation, selective and normal growth, and the extracellular matrix on proliferation and morphology. *Chibret Int J Ophthalmol.*;7:3-13.
- Engelmann K, Bednarz J, Böhnke M (1999). Endothelial cell transplantation and growth behavior of the human corneal endothelium. *Ophthalmologe.*;96:555-562.
- Esch F, Ueno N, Baird F, Hill F, Denoroy L, Ling N, Gospodarowicz D, Guillemin R (1985). Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun.*;133:554-562.
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoebe RC, Van Der Eb AJ (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.*;7:215-222.
- Farhood H, Serbina N, Huang L (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta.*;1235:289-295.
- Fehervari Z, Rayner SA, Oral HB, George AJ, Larkin DF (1997). Gene transfer to ex vivo stored corneas. *Cornea.*;16:459-464.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem.*;269:2550-2561.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.*;147:3815-3822.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.*;146:3444-3451.
- Frueh BE, Böhnke M (1995). Corneal grafting of donor tissue preserved for longer than 4 weeks in organ-culture medium. *Cornea.*;14:463-466.
- Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Campos L (2001). In situ immunohistochemical study of Bcl-2 and heat shock proteins in human corneal endothelial cells during corneal storage. *Br J Ophthalmol.*;85:996-1000.
- Gajewski TF, Fitch FW (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol.*;140:4245-4252.
- George AJ, Arancibia-Carcamo CV, Awad HM, Comer RM, Fehervari Z, King WJ, Kadifachi M, Hudde T, Kerouedan-Lebosse C, Mirza F, Barbaros Oral H, Rayner SA, Tan PH, Tay E, Larkin DF (2000). Gene delivery to the corneal endothelium. *Am J Respir Crit Care Med.*;162:194-200.
- Gill TJ, Kunz HW, Misra DN, Hassett ALC (1987). The major histocompatibility complex of the rat. *Transplantation.*;43:773-785.
- Goerdts S, Orfanos CE (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.*;10:137-142.
- Gore SM, Vail A, Bradley BA, Rogers CA, Easty DL, Armitage WJ (1995). HLA-DR matching in corneal transplantation. Systematic review of published evidence. Corneal Transplant Follow-up Study Collaborators. *Transplantation.*;60:1033-1039.
- Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR (1977). Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res.*;25:75-89.

- Gospodarowicz D, Greenburg G (1979). The effects of epidermal and fibroblast growth factors on the repair of corneal endothelial wounds in bovine corneas maintained in organ culture. *Exp Eye Res.*;28:147-157.
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986). Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ.*;19:1-17.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.*;36:59-74.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995). Fas-ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.*;270:1189-1192.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.*;389:737-742.
- Guillot C, David A, Coathalem H, Froud D, Tesson L, Moullier P, Le Mauff B, Usal C, Soullillou JP, Cuturi MC, Anegon I (1999). Adenovirus-mediated cytokine gene transfer in heart allograft transplantation. *Biochem Soc Trans.*;27:864-869.
- Haskova Z, Usiu N, Pepose JS, Ferguson TA, Stuart PM (2000). CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. *Transplantation.*;69:483-487.
- Hawley-Nelson P, Ciccaroni V, Gebeyehu G, Jessee J (1993). Lipofectamine reagent: a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus.*;15:73-79.
- He YG, Ross J, Niederkorn JY (1991). Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;32:2723-2728.
- He XY, Chen J, Verma N, Plain K, Tran G, Hall BM (1998). Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart graft survival by inducing T helper 2 responses. *Transplantation.*;65:1145-1152.
- Hedge S, Niederkorn JY (2000). The role of cytotoxic T lymphocytes in corneal allograft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41:3341-3347.
- Holland EJ, Chan CC, Wetzig RP, Palestine AG, Nussenblatt RB (1991). Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model. *Cornea.*;10:374-380.
- Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Treffers WF (1994). Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;35:931-944.
- Horwitz MS (1990). Adenoviridae and their replication. In *Virology*. B.N. Fields and D.M. Knipe, editors. Raven Press, New York. 1679-1721.
- Houssaint E, Blanquet PR, Champion-Arnaud P, Gesnel MC, Torriglia A, Courtois Y, Breathnach R (1990). Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA.*;87:8180-8184.
- Huang S, Kamata T, Takada Y, Ruggeri ZM, Nemerow GR (1996). Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol.*;70:4502-4505.
- Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T (1990). Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science.*;249:1567-1570.
- Jackson A, Friedman S, Zhan X, Engleka KA, Forough R, Maciag T (1992). Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89:10691-10695.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu IM, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN (1986). Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science.*;233:541-545.
- Joo CK, Pepose JS, Stuart PM (1995). T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;36:1530-1540.
- Josien R, Muschen M, Gilbert E, Douillard P, Heslan JM, Soullillou JP, Cuturi MC (1998). Fas ligand, tumor



- necrosis factor- $\alpha$  expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation*.;66:887-893.
- Joyce NC (2003). Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Ret Eye Res*.;22:359-389.
- Kato H, Fieblinger C, Ke B, Li J, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Ritter T (1999). Synergistic effects of cytokine gene transfer in high responder rat renal allograft recipients. (Abstract) *Transplantation*, 67:570.
- Kato H, Ritter T, Murakami M, Kusano M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of IL-4 prolongs rat renal allograft survival and inhibits the p21ras-activation pathway. *Transpl Proceed*.;32:245-246.
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*.;7:2133-2140.
- Ke B, Ritter T, Kato H, Zhai Y, Li J, Lehmann M, Busuttil RW, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW (2000). Regulatory cells potentiate the efficacy of IL-4 gene transfer by up-regulating Th2-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway in transplant recipients. *J Immunol*.;164:5739-5745.
- Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, Ritter T, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2002). Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther*.;13:1189-1199.
- Kennedy MK, Picha KS, Shanebeck KD, Anderson DM, Grabstein KH (1994). Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur J Immunol*.;24:2271-2278.
- King WJ, Comer RM, Hudde T, Larkin DF, George AJ (2000). Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. *Transplantation*.;70:1225-1233.
- Klebe S, Sykes PJ, Coster DJ, Krishnan R, Williams KA (2001). Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *Transplantation*.;71:1214-1220.
- Kolls J, Peppel K, Silva M, Beutler B (1994). Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;91:215-219.
- Landshman N, Belkin M, Ben-Hanan I, Ben-Chaim O, Assia E, Savion N (1987). Regeneration of cat corneal endothelium induced in vivo by fibroblast growth factor. *Exp Eye Res*.;45:805-811.
- Larkin DFP (1994). Corneal allograft rejection. *Br J Ophthalmol*.;78:649-652.
- Larkin DF, Oral HB, Ring CJ, Lemoine NR, George AJ (1996). Adenovirus-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplantation*.;613:363-370.
- Lee ER, Marshall J, Siegel CS, Jiang C, Yew NS, Nichols MR, Nietupski JB, Ziegler RJ, Lane MB, Wang KX, Wan NC, Scheule RK, Harris DJ, Smith AE, Cheng SH (1996). Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther*.;7:1701-1717.
- Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L (1998). Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther*.;5:930-937.
- Lovicu FJ, de Jongh RU, McAvoy JW (1997). Expression of FGF-1 and FGF-2 mRNA during lens morphogenesis, differentiation and growth. *Curr Eye Res*.;16:222-230.
- Ma Y, Hurst HE, Fernandez-Botran R (1996). Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble interleukin-4 receptors on the pharmacokinetics of murine interleukin-4. *J Pharmacol Exp Ther*.;279:340-350.
- Mascarelli F, Fuhrmann G, Courtois Y (1993). aFGF binding to low and high affinity receptors induces both aFGF and aFGF receptor dimerization. *Growth Factors*.;8:211-233.
- Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*.;151:81-93.
- Modrow S, Falke D (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 391-406.

- Mosmann TR, Coffman RL (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.*;7:145-173.
- Mottram PL, Han WR, Purcell LJ, McKenzie IF, Hancock WW (1995). Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation.*;59:559-565.
- Mueller R, Davies JD, Krah T, Sarvetnick N (1997). IL-4 expression by grafts from transgenic mice fails to prevent allograft rejection. *J Immunol.*;159:1599-1603.
- Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ (1993). Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature.*;362:844-846.
- Nelson D, Cox M (2001). *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Nickerson P, Pacheco-Silva A, O'Connell PJ, Steurer W, Kelley VR, Strom TB (1993). Analysis of cytokine transcripts in pancreatic islet cell allografts during rejection and tolerance induction. *Transplant Proc.*;25:984-985.
- Nickerson P, Steiger J, Zheng XX, Steele AW, Steurer W, Roy-Chaudhury P, Strom TB (1997). Manipulation of cytokine networks in transplantation: false hope or realistic opportunity for tolerance? *Transplantation.*;63:489-494.
- Niederhorn JY (1999). Anterior chamber associated immune deviation. *Chem Immunol.*;73:59-71.
- Nishi Y, Hosokawa T, Aoike A, Kawai K, Kamahara T (1990). Early development of CD8-negative and CD8-positive MHC-unrestricted cytotoxic cells induced by alloantigen inoculation in mice. *Microbiol Immunol.*;34:775-785.
- Nunez R, Ackermann M, Saeki Y, Chiocca A, Fraefel C (2001). Flow cytometric assessment of transduction efficiency and cytotoxicity of Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Cytometry.*;44:93-99.
- Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P (2002). The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther.*;13:1167-1178.
- Oral HB, Larkin DFP, Fehervari Z, Byrnes AP, Rankin AM, Haskard DO, Wood MJ, Dallman MJ, George AJ (1997). Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer and immunomodulatory protein production in human cornea. *Gene Ther.*;4:639-647.
- Ornitz D, Yayon A, Flanagan J, Svann C, Levi E, Leder P (1992). Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol.*;12:240-247.
- Ornitz DM (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.*;22:108-112.
- Oshima Y, Sakamoto T, Hisatomi T, Tsutsumi C, Sassa Y, Ishibashi T, Inomata H (2002). Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses. *Exp Eye Res.*;74:191-198.
- Paul WE (1991). Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.*;77:1859-1870.
- Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK (1997). Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation.*;63:619-624.
- Pleyer U, Steuhl KP, Weidle EG, Lisch W, Thiel HJ (1992). Corneal graft rejection: incidence, manifestation, and interaction of clinical subtypes. *Transplant Proc.*;24:2034-2037.
- Pleyer U, Milani JK, Dukes A, Chou J, Lutz S, Ruckert D, Thiel HJ, Mondino BJ (1995). Effect of topically applied anti-CD4 monoclonal antibodies on orthotopic corneal allografts in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;36:52-61.
- Pleyer U und Thiel HJ (1995). Cytotoxic mechanisms in corneal allograft rejection. In: Pleyer U, Schmidt KH, Thiel HJ (Eds.) *Cell and tissue protection in ophthalmology*. Thieme/Hippokrates, Stuttgart, pp:71-82.
- Pleyer U, Rieck P, Ritter T, Hartmann C (1998). Immune reaction after penetrating keratoplasty. II. Prevention and therapy. *Ophthalmologe.*;95:444-459.

- Pleyer U, Bertelmann E, Rieck P, Hartmann C, Volk HD, Ritter T (2000). Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238:531-536.
- Pleyer U, Dannowski H, Volk HD, Ritter T (2001a). Corneal allograft rejection: current understanding. I. Immunobiology and basic mechanisms. *Ophthalmologica*, 215:254-62.
- Pleyer U, Groth D, Hinz B, Keil O, Bertelmann E, Rieck P, Reszka R (2001b). Efficiency and toxicity of liposome-mediated gene transfer to corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*, 73:1-7.
- Pleyer U, Dannowski H (2002). Delivery of genes via liposomes to corneal endothelial cells. *Drug News Perspect*, 15:283-289.
- Pleyer U, Ritter T (2003). Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog Retin Eye Res*, 22:277-293.
- Powrie F, Menon S, Coffman RL (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol*, 23:2223-2229.
- Qian Y, Dana MR (2001). Molecular mechanism of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation. *Expert Rev Mol Med*, 3:1-21.
- Qin L, Chavin KD, Ding Y, Favaro JP, Woodward JE, Lin J, Tahara H, Robbins P, Shaked A, Ho DY, et al. (1995). Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation*, 59:809-816.
- Qin L, Ding Y, Pahud DR, Robson ND, Shaked A, Bromberg JS (1997a). Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther*, 8:1365-1374.
- Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS (1997b). Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther*, 8:2019-2029.
- Rayner SA, Larkin DFP, George AJT (2001). TNF receptor secretion after ex vivo adenoviral gene transfer to cornea and effect on in vivo graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42:1568-1573.
- Redbrake C, Salla S, Frantz A, Reim M (1999). Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmol Scand*, 77:266-272.
- Regelin AE, Fankhaenel S, Gürtesch L, Prinz C, von Kiedrowski G, Massing U (2000). Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochim Biophys Acta*, 1464:151-164.
- Reinhard T, Hutmacher M, Sundmacher R (1997). Acute and chronic immune reactions after penetrating keratoplasty with normal immune risk. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 210:139-143.
- Rieck P, Oliver L, Engelmann K, Fuhrmann G, Hartmann C, Courtois Y (1995). The role of exogenous/endogenous basic fibroblast growth factor (FGF2) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) on human corneal endothelial cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res*, 220:36-46.
- Rieck PW, Gigon M, Jaroszewski J, Pleyer U, Hartmann C (2003). Increased endothelial survival of organ-cultured corneas stored in FGF-2-supplemented serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44:3826-3832.
- Rinne JR, Stulting RD (1992). Current practices in the prevention and treatment of corneal graft rejection. *Cornea*, 11:326-328.
- Ritter T, Vogt K, Rieck P, Schilling-Schön A, Kolls J, Hartmann C, Volk HD, Pleyer U (1999a). Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 to corneal endothelial cells and organ cultured corneas leads to high IL-4 expression. *Exp Eye Res*, 69:563-568.
- Ritter T, Risch K, Schroder G, Kolls J, Siegling A, Graser E, Reinke P, Brock J, Lehmann M, Volk HD (1999b). Intragraft overexpression of interleukin-4 is neither sufficient nor essential for tolerance induction to cardiac allografts in a high-responder strain combination. *Transplantation*, 68:1427-1431.
- Ritter T, Brandt C, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, Volk HD (2000). Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells.

- Cytokine.;12:1163-1170.
- Ritter T, Lehmann M, Volk HD (2002). Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *Bio Drugs*.;16:3-10.
- Ritter T (2003). Anti-inflammatorische und zytoprotektive Gentherapie am Beispiel der experimentellen Transplantation. Habilitationsschrift.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*.;74:5463-5467.
- Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S (1998). Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.;39:1953-1957.
- Sawitzki B, Amersi F, Ritter T, Fisser M, Shen XD, Ke B, Busuttill R, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW (2002). Upregulation of Bag-1 by ex vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Hum Gene Ther*.;13:1495-1504.
- Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA (1995). CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med*.;181:1869-1874.
- Schilling-Schön A, Pleyer U, Hartmann C, Rieck PW (2000). The role of endogenous growth factors to support corneal endothelial migration after wounding in vitro. *Exp Eye Res*.;71:583-589.
- Schmidt N (2004). Immunhistologische Untersuchung von infiltrierenden Zellen nach adenoviraler vIL-10-Transduktion in der experimentellen Keratoplastik. (Dissertation in Vorbereitung).
- Slegers TP, Torres PF, Broersma L, van Rooijen N, van Rij G, van der Gaag R (2000). Effect of macrophage depletion on immune effector mechanisms during corneal allograft rejection in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.; 41:2239-2247.
- Slegers TP, van der Gaag R, van Rooijen N, van Rij G, Streilein JW (2003). Effect of local macrophage depletion on cellular immunity and tolerance evoked by corneal allografts. *Curr Eye Res*.;26:73-79.
- Smith DK, Korbitt GS, Suarez-Pinzon WL, Kao D, Rajotte RV, Elliott JF (1997). Interleukin-4 or interleukin-10 expressed from adenovirus-transduced syngeneic islet grafts fails to prevent beta cell destruction in diabetic NOD mice. *Transplantation*.; 64:1040-1049.
- Sorgi FL, Bhattacharya S, Huang L (1997). Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther*.;4:961-968.
- Steiger J, Nickerson PW, Steurer W, Moscovitch-Lopatin M, Strom TB (1995). IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol*.;155:489-498.
- Stein J, Volk HD, Liebenthal C, Kruger DH, Prosch S (1993). Tumor necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol*.;74:2333-2338.
- Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA (1997). CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest*.;99:396-402.
- Stübiger N, Pleyer U, Erb C, Thiel HJ (1995). Keratoplasty a chaud. *Ophthalmologe*.;92:427-432.
- Sung RS, Qin L, Bromberg JS (2001). TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol Ther*.;3:757-767.
- Swain SL (1995). CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview. *J Leukoc Biol*.;57:795-798.
- Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B (1992). Heart grafts in murine systems: the differential activation of Th2-like effectors in peripheral tolerance. *Transplantation*.;53:1281-1294.
- Takeuchi T, Ueki T, Sunaga S, Ikuta K, Sasaki Y, Li B, Moriyama N, Miyazaki JI, Kawabe K (1997). Murine interleukin 4 transgenic heart allograft survival prolonged with down-regulation of the TH1 cytokine mRNA in grafts. *Transplantation*.;64:152-157.
- Tan PH, King WJ, Chen D, Awad HM, Mackett M, Lechler RI, Larkin DFP, George AJT (2001). Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation*.;74:552-560.

- Tan PH, Manunta M, Ardmand N, Xue SA, Larkin DF, Haskard D, Taylor KM, George AJ (2003). Antibody targeted gene transfer to endothelium. *J Gene Med.*;5:311-323.
- Thanh HN, Murakami A, Fujiki K, Kanai A (2002). Transferrin-Polyethylenimine conjugate, Eugene6 and Transit-LT as non-viral vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol.*;46:140-146.
- Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY (1995). Global data on blindness. *Bull World Health Organ.*;73:115-121.
- Torres PF, de Vos AF, van der Gaag R, Martins B, Kijlstra A (1996). Cytokine mRNA expression during experimental corneal allograft rejection. *Exp Eye Res.*;63:453-461.
- Torres PF, de Vos AF, Martins B, Kijlstra A (1999). Interleukin 10 treatment does not prolong experimental corneal allograft survival. *Ophthalmic Res.*;31:297-303.
- Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T (2002). Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol Pharm Bull.*;25:891-897.
- Vail A, Gore SM, Bradley BA, Easty DL, Rogers CA, Armitage WJ (1994). Influence of donor and histocompatibility factors on corneal graft outcome. *Transplantation.*;58:1210-1216.
- Verma IM, Somia N (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.*;389:239-242.
- Wackenheim-Urlacher A, Kantelip B, Falkenrodt A, Piqot X, Tongio MM, Montard M, Delbosc B (1995). T-cell repertoire of normal, rejected, and pathological corneas: phenotype and function. *Cornea.*;14:450-456.
- Wiedlocha A, Falnes PO, Rapak A, Munoz R, Klingenberg O, Olsnes S (1996). Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol Cell Biol.*;16:270-280.
- Williams KA, Coster DJ (1997). Rethinking immunological privilege: implications for corneal and limbal stem cell transplantation. *Mol Med Today.*;3:495-501.
- Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He YG (1994). Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res.*;59:63-72.
- Wold WS, Gooding LR (1991). Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology.*;184:1-8.
- Xu Y, Szoka FC Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry.*;35:5616-5623.
- Yamada J, Yoshida M, Taylor AW, Streilein JW (1999). Mice with Th2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in high risk eyes. *J Immunol.*;162:5247-5255.
- Yamada J, Ksander BR, Streilein JW (2001). Cytotoxic T cells play no essential role in acute rejection of orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;42:386-392.
- Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Gregerson DS (1997). Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation.*;64:1107-1111.
- Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M (1998). Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation.*;66: 1504-1510.
- Yang J, Reutzel-Selke A, Steier C, Jurisch A, Tullius SG, Sawitzki B, Kolls J, Volk HD, Ritter T (2003). Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model. *J Am Soc Nephrol.*;14:214-225.
- Yang J, Pleyer U, Dannowski H, Vogt K, Hempel M, Volk HD, Ritter T (2004). Effects of local interleukin-12p40 gene therapy on rat corneal allograft survival. (zur Veröffentlichung eingereicht).
- Yang Y, Ertl HCJ, Wilson J (1994). MHC class-I restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy

- hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenovirus. *Immunity*.;1:433-442.
- Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*.;270:18997-19007.
- Zhan X, Hu X, Friedman S, Maciag T (1992). Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*.;188:982-991.
- Zhou XH, Huang L (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*.;1189:195-203.
- Zuo Z, Wang C, Carpenter D, Okada Y, Nicolaidou E, Toyoda M, Trento A, Jordan SC (2001). Prolongation of allograft survival with viral IL-10 transfection in a highly histoincompatible model of rat heart allograft rejection. *Transplantation*.;71:686-691.

## Anhang

### Publikationen und Kongressbeiträge

#### Publikationen:

Pleyer U, Dannowski H, Volk HD, Ritter T (2001). Corneal allograft rejection: current understanding. I. Immunobiology and basic mechanisms. Ophthalmologica. 215:254-262. Review

Pleyer U, Dannowski H, Reszka R, Volk HD, Hartmann C, Ritter T (2001). Gene therapy in ophthalmology. Review of options and trends in corneal diseases. Klin Monatsbl Augenheilkd. 218:140-147. Review. German.

Pleyer U, Dannowski H (2002). Delivery of genes via liposomes to corneal endothelial cells. Drug News Perspect 15:283-289.

Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U (2002). Calcium influx induced by activation of receptor tyrosine kinases in human corneal endothelial cells. Exp Eye Res 77:485-495.

Dannowski H, Bednarz J, Reszka R, Engelmann K, Pleyer U (2004). Liposomal and non-liposomal gene transfer of acidic fibroblast growth Factor (aFGF) into human corneal endothelial cells (HCEC).(zur Veröffentlichung eingereicht bei Exp Eye Res)

Yang J, Pleyer U, Dannowski H, Vogt K, Hempel M, Volk HD, Ritter T (2004). Effects of local interleukin-12p40 gene therapy on rat corneal allograft survival. (zur Veröffentlichung eingereicht).

**Kongressbeiträge; Vorträge\* und Poster****ARVO 2001 Annual Meeting in Fort Lauderdale, Florida, USA (29.4.-4.5.2001)**

Dannowski H\*, Bednarz J, Reszka R, Engelmann K, Pleyer U (2001). Liposomal and nonliposomal Gene Transfer of Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) into Human Corneal Endothelial Cells (HCEC). Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:105.

Mergler S, Dannowski H, Engelmann K, Pleyer U (2001). Intracellular calcium increase mediated by acidic (aFGF) and basic (bFGF) fibroblast growth factors in SV 40 transfected cultured human corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:274.

**99. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin (29.9.-2.10.2001)**

Dannowski H\*, Bednarz J, Reszka R, Engelmann K, Pleyer U. Der Effekt von Lipid-vermitteltem Gentransfer des sauren Fibroblasten-Wachstumsfaktors (aFGF) auf die Proliferation humaner kornealer Endothelzellen (HCEC) in vitro. Ophthalmologe 22:Suppl.1.

**ARVO 2002 Annual Meeting in Fort Lauderdale, Florida, USA (5.5.-10.5.2002)**

Sedlakova K, Dannowski H, Brandt C, Schmidt N, Filipec M, Hartmann C, Ritter T, Pleyer U (2002). Adenovirus-Mediated Gene Transfer of vIL-10 in Experimental Corneal Transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 43: E-Abstract 2279.

Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U (2002). Electrophysiological properties in cultured human corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43: E-Abstract 3138.

**100. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin (26.9.-29.9.2002)**

Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U (2002). Elektrophysiologische Untersuchungen an Zellkulturen des humanen Hornhautepithels. Ophthalmologe 191:Suppl.1.



**EVER 2002 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision, Alicante, Spanien (2.10.-5.10.2002)**

Schmidt N, Dannowski H, Sedlakova K, Ritter T, Pleyer U (2002). Immunohistological investigation of infiltrating cells after viral interleukin-10 transduction in experimental keratoplasty. Ophthalmic Res 34:Suppl.1:39.

**ARVO 2003 Annual Meeting in Fort Lauderdale, Florida, USA (4.5.-9.5.2003)**

Dannowski H, Bednarz J, Reszka R, Engelmann K, Pleyer U (2003). Lipid-mediated Gene Transfer of EGFP into Human Corneal Endothelial Cells (HCEC). Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: E-Abstract 845.

Schmidt N, Dannowski H, Sedláková K, Ritter T, Pleyer U (2003). Immunohistological Investigation of Infiltrating Cells after Viral Interleukin-10 Transduction in Experimental Keratoplasty. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: E-Abstract 4659.

Yang J, Pleyer U, Dannowski H, Vogt K, Hempel M, Ritter T (2003). Effects of Adenovirus-mediated Gene Transfer of IL-12p40 on Corneal Allograft Survival. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: E-Abstract 4656.

Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U (2003). L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity in cultured human corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44: E-Abstract 4728.

**IOIS - VII international Symposium on ocular inflammation, Padova, Italien (25.5.-30.5.2003)**

Pleyer U, Yang J, Dannowski H, Ritter T (2003). Effect of interleukin-12p40 on experimental keratoplasty.

**101. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin (25.9.-28.9.2003)**

Mergler S, Dannowski H, Bednarz J, Engelmann K, Hartmann C, Pleyer U (2003). Aktivierung von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in kultivierten humanen kornealen Endothelzellen über Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF): Unterschiede zwischen a-FGF und b-FGF. Ophthalmologie 100:Suppl.1

**34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin (24.9.-27.9.2003)**

Yang J, Pleyer U, Dannowski H, Vogt K, Hempel M, Volk HD, Ritter T (2003). Effect of adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-12p40 on corneal allograft survival.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Ritter, der mich während meiner gesamten Diplom- und Promotionszeit hervorragend betreute und mir immer mit seiner freundschaftlichen Unterstützung zur Seite stand. Er vermittelte auch den Kontakt zur Augenklinik.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Pleyer möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit bedanken und für seine Geduld und Hilfe auch in schwierigen Situationen. Außerdem habe ich mich sehr über die Möglichkeit gefreut, mehrfach „die ARVO“ zu besuchen. Vielen Dank auch dafür.

Herrn Prof. Dr. Richard Lucius danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Betreuung als Vertreter der Humboldt-Universität. Auch ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Augenklinik und des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité, sowie anderer Einrichtungen bedanken, die mir durch Beantwortung von Fragen, Beschaffung von Materialien und auch durch aufmunternden Humor Verständnis und Hilfe entgegenbrachten.

Herr Dr. Jürgen Bednarz und Frau Prof. Dr. Katrin Engelmann aus Hamburg stellten die immortalisierten HCEC zur Verfügung und standen mir bei allen Fragen zu ihren Besonderheiten klärend zur Seite.

Frau Dr. Regina Reszka und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung des DAC-30 Liposoms und für die Aufarbeitung des aFGF-Plasmids.

Frau Sylvia Metzner war meine Ansprechpartnerin in der Ziegelstraße und trug durch ihre Kompetenz in Zellkulturfragen ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit bei. Darüberhinaus habe ich ihren Überblick in Büro- und Rechnungsangelegenheiten immer sehr geschätzt und bedanke mich für unsere gute Zusammenarbeit.

Frau Nadine Schmidt möchte ich besonders für den freundschaftlichen Zusammenhalt in unserer gemeinsamen Krisenzeit danken und für die Bereitstellung der immunhistologischen Abbildungen.

Frau Dr. Christine Brandt danke ich sehr herzlich für ihre kompetente Einführung in die MLR und die Durchflusszytometrie und ebenso Herrn PD Dr. Florian Kern für die Diskussion der Auswertungsmöglichkeiten.

Frau Ines Ecke und Frau Michaela Hempel brachten mir den Western Blot näher. Frau Anke Sänger fertigte die Elektronen-mikroskopischen Aufnahmen an. Frau MUDr. Klara Sedlakova und Herr Dr. Nianqiao Gong führten mit viel Fingerspitzengefühl die Keratoplastiken durch. Auch ihnen gilt mein Dank.

Herrn Prof. Hans-Dieter Volk und Herrn Dr. Erich Knop danke ich für die abschließende Sichtung meiner Dissertation und die wertvollen Hinweise, die sie mir noch gaben.

Bei Stephan möchte ich mich für seine unermüdliche Hilfe bei allen Computerproblemen, sein Verständnis in „anstrengenden Zeiten“ und das Leben außerhalb von Brutschränken und Sterilbänken bedanken.

Meiner Mutter danke ich aus ganzem Herzen für ihre Freundschaft, Unterstützung und Motivation und ihr Vorbild, das mir immer Ansporn war.

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 16.2.2004

Haike Dannowski